

Neuro-Immun-Interaktionen zwischen Makrophagen und sensorischen Neuronen

Untersuchungen im Kokultur-Modell und bei der
Antigen-induzierten Arthritis

Dissertation

**Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Julia Massier

02.05.1985

Gutachter

1. Prof. Dr. Hans-Georg Schaible; Institut für Neurophysiologie;
Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. Peter Zipfel; Abteilung Infektionsbiologie; Hans-Knöll-Institut Jena
3. Prof. Dr. Rainer H. Straub, Abteilung Innere Medizin; Universitätsklinikum
Regensburg.

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.09.2014

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	4
1 Einleitung	6
1.1 Makrophagen	6
1.2.1 Funktion bei der angeborenen und adaptiven Immunität	6
1.2.2 Entwicklung und Aktivierung von Makrophagen	7
1.2 Schmerz und Nozizeption	9
1.3 Periphere Mechanismen der Nozizeption	11
1.3.1 Nozizeptoren	11
1.3.2 Schmerz als ein Ergebnis von Neuro-Immun-Interaktionen	11
1.4 Die rheumatoide Arthritis	14
1.5 Das AIA-Modell	16
1.6 Ziele der Arbeit	17
2. Methoden und Materialien	19
2.1 Versuchstiere	19
2.2 Primäre Zellkulturen	19
2.2.1 Vorbereitung von Verbrauchsmaterialien für die Zellkultivierung	19
2.2.1.1 Beschichtung von Glas-Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	19
2.2.1.2 Beschichtung und Vorbereitung von Pasteurpipetten für die Neuronen-Präparation	20
2.2.2 Präparation von DRG-Neuronen	20
2.2.3 Isolation von Knochenmarkzellen und deren Differenzierung zu Makrophagen ...	21
2.2.4 Aktivierung von reifen BMDM	21
2.4 Calcium-Imaging in Mono- und Kokultur als Vitalitätstest	24
2.5 Vitalitätstest mit Trypanblau	25

2.6 NO-Detektion mit Griess Reagenz.....	25
2.6.1 NO-Freisetzung der verschiedenen Makrophagentypen in Mono- und Kokultur	25
2.6.2 Test des iNOS-Inhibitors Aminoguanidin Hydrochlorid	26
2.7 ELISA's von Kulturüberständen	27
2.7.1 Analyse von TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-10 in Makrophagen-Monokultur- und in Kokulturüberständen	27
2.7.2 Analyse der CGRP-Freisetzung in Neuronen-Monokultur und Kokultur	27
2.8 Antikörpermarkierung in Zellkultur, Milz- und DRG-Schnitten	29
2.8.1 Immunzytologie	29
2.8.1.1 Fluoreszenzmarkierungen	30
2.8.1.2 Peroxidasemarkierungen	30
2.8.2 Immunhistologie.....	30
2.8.2.1 Induktion einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) bei Maus und Ratte.....	30
2.8.2.2 Präparation von lumbalen und thorakalen DRGs.....	31
2.8.2.3 Einbettung der Ganglien in Paraffin und Anfertigung von Paraffinschnitten..	31
2.8.2.4 Entparaffinierung und Antikörpermarkierung von DRG-Schnitten.....	32
2.8.2.5 Abweichendes Vorgehen bei der Herstellung von Milzschnitten	32
2.8.2.6 Herstellung von DRG- und Milz- Kryoschnitten.....	32
2.8.2.7 Mikroskopie	33
2.9 Proliferationsassay mit Bromodesoxyuridin (BrdU).....	37
2.10 Western Blot.....	38
2.10.1 Probenaufarbeitung: Zelllyse und Proteinextraktion.....	39
2.10.2 Gel-Elektrophorese.....	39
2.10.3 Western Blot und CD3-Antikörpermarkierung.....	40
2.11 Statistische Auswertung	41
3. Ergebnisse	43
3.1 BMDM in Monokultur	43
3.1.1 Morphologie der Differenzierungsstadien	43

3.1.2 Charakterisierung der BMDM mit typischen Makrophagenmarkern	44
3.1.3 Zytokinsekretion in BMDM-Monokultur	46
3.2 DRG-Neurone in Monokultur	48
3.3 Kokultivierung von BMDM und DRG-Neuronen	49
3.3.1 Etablierung einer direkten und indirekten Kokultur	49
3.3.2 Prinzip der Kokultur-Analyse im Calcium Imaging	50
3.3.3 Zytokinproduktion in Kokultur	52
3.3.4 Neuronaler Zelltod	52
3.3.4.1 Trypanblau Analyse in Kokulturen im Vergleich zu Neuronen-Monokulturen	52
3.3.4.2 Einfluss des von BMDM freigesetzten NO auf den neuronalen Zelltod in Kokultur	54
3.3.5 CGRP-Freisetzung in direkter Kokultur	56
3.3.6 Modulation der Proliferationsrate von BMDM.....	57
3.3.6.1 Proliferation von BMDM in Monokultur und direkter Kokultur	57
3.3.6.2 Einfluss verschiedener TNF- α Inhibitoren und des iNOS Inhibitors in direkter Kokultur auf die Proliferationsrate von Makrophagen im Bereich „Mitte“	59
3.4 Analyse des Expressionsmusters von DRG-immigrierten Makrophagen und ihrer potentiellen Rolle im Verlauf der AIA.....	60
3.4.1 Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Makrophagentypen <i>in vitro</i> .	60
3.4.2 DRG-immigrierte Makrophagen sind nicht aggressiv, aber potentiell pronozeptiv	62
3.4.3 Stimulation von DRG-Neuronen in vitro mit IL6/sIL6R.....	64
3.5 Neuronale Anfärbungen mit Immunmarkern	65
3.5.1 CD68 Anfärbungen im DRG, Rückenmark und in Zellkultur	65
3.5.2 CD11a, CD11b und F4/80 Markierungen im DRG der Maus	67
3.5.3 Anfärbung von DRG-Neuronen mit „T-Zell spezifischen“ Antikörpern.....	68
4. Diskussion	71
4.1 Methodische Betrachtungen zur Monokultivierung.....	71

4.1.1 BMDM-Monokulturen	71
4.1.2 DRG-Monokulturen	72
4.2 Methodische Aspekte der Kokultivierung.....	72
4.3 Interaktionen von BMDM und DRG-Neuronen in Kokultur	73
4.3.1 Beeinflussung der neuronalen Vitalität in Kokultur	73
4.3.2 Beeinflussung der neuronalen Aktivität in Kokultur	75
4.3.3 Charakteristische Zytokinproduktion von BMDM in Monokultur und in Kokultur	76
4.3.4 Beeinflussung der Proliferationsrate von BMDM in Kokultur	77
4.4 Einwanderung von nicht aggressiven, potentiell pronozizeptiven Makrophagen in die DRGs der Ratte in der akuten Phase der AIA	79
4.5 Neuronale Anfärbung mit Immunmarkern: Echt oder ein Artefakt?	80
Abbildungsverzeichnis	82
Tabellenverzeichnis.....	83
Quellenverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammonium Persulfat
Arg1	Arginase1
ASIC	acid sensing ion channel
ATF3	cyclic AMP-dependent transcription factors 3
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
BMDM	bone marrow-derived macrophages (Knochenmarks-generierte Makrophagen)
CD	cluster of differentiation
COX-2	Cyclooxygenase 2
CFA	complete Freund's adjuvant
CGRP	calcitonin gene related peptide
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	dorsal root ganglia (Hinterwurzelganglien)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA-Puffer	Enzyme immunoassay-Puffer
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
Fura-2/AM	Fura-2 acetoxymethylester

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Iba1	ionized calcium binding adapter molecule 1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intra peritoneal
LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal
mBSA	methyliertes bovines Serumalbumin
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor (Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mind.	mindestens
MW	Mittelwert
NED	N-(1-naphtyl)ethylenediamid
NGF	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
PAMP	pathogen associated molecular pattern (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBA	PBS mit BSA
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
RA	rheumatoide Arthritis
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
sIL-6R	soluble IL-6 receptor (löslicher Interleukin 6 Rezeptor)
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCR	T-cell-receptor (T-Zell-Rezeptor)

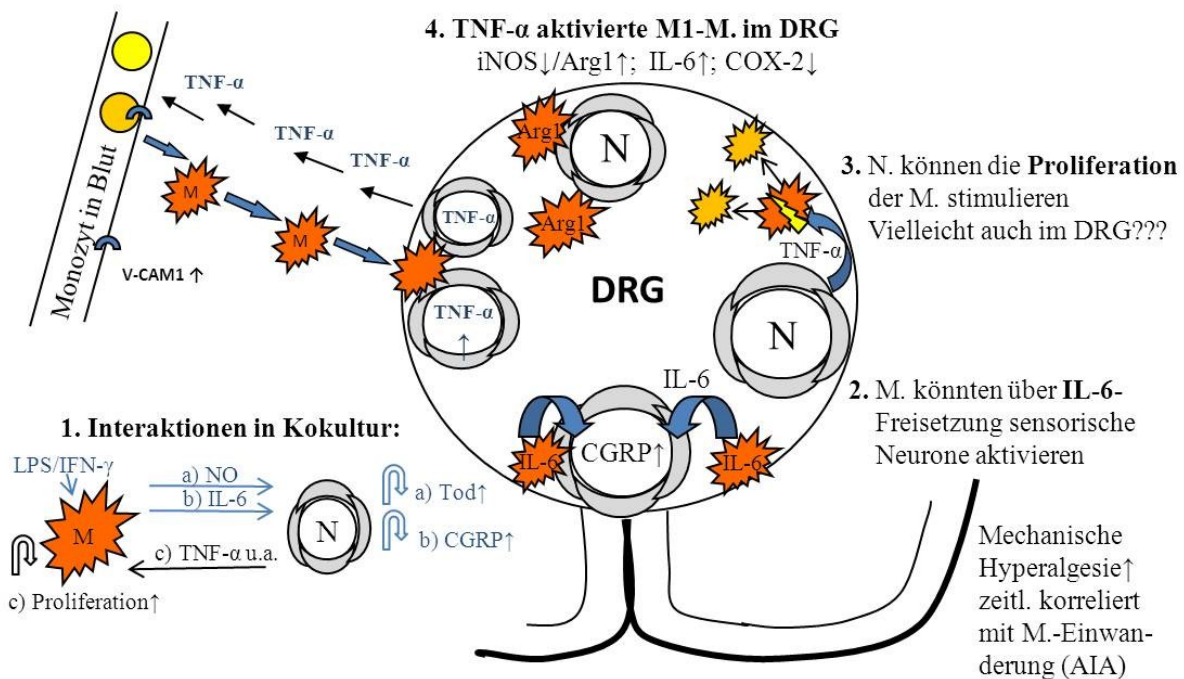
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _H 1-Zellen	T-Helfer1-Zellen
TLR4	toll like receptor 4
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
TNFR-A	TNF-Rezeptorantagonist
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA	tropomyosin-receptor-kinase A
TRPV1-Rezeptor	transient receptor potential vanilloid-1-receptor
TX-100	Triton X-100
V-CAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Methode der Kokultivierung muriner Knochenmarks-generierter Makrophagen (bone marrow-derived macrophages = BMDM) und Hinterwurzelganglion-Neurone (dorsal root ganglion-neurons = DRG-Neurone) etabliert. Die Kokultur kann genutzt werden, um Neuro-Immun-Interaktionen zu untersuchen, die eine entscheidende Rolle in verschiedenen peripheren neuroinflammatorischen und neuropathischen Krankheiten spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen BMDM und DRG-Neuronen vor allem von dem Aktivierungsstadium der Makrophagen und dem Abstand zwischen den beiden Zelltypen abhängig sind. Eine kurzzeitige Stimulation (20 min) der BMDM mit LPS/IFN- γ in direkten Kokulturen bewirkte eine Erhöhung der neuronalen Aktivität, gemessen an der CGRP-Freisetzung. Diese war unabhängig von der NO-Produktion der Makrophagen. Eine langfristige LPS/IFN- γ -Aktivierung (48 Stunden) der BMDM verursachte eine enorme Steigerung der neuronalen Mortalitätsrate, wenn BMDM und DRG-Neurone in nahem Kontakt standen, aber nicht wenn sie indirekt, ohne direkte Zellkontakte, kultiviert wurden. Dieser Erhöhung des neuronalen Zelltodes konnte durch eine Inhibierung der NO-Freisetzung signifikant entgegen gewirkt werden, sodass NO ein zentraler Auslöser der Neuronen-Schädigung zu sein scheint. Demgegenüber war die Todesrate der Neurone in unstimulierten, IL-4- und TNF- α -stimulierten direkten Kokulturen im Vergleich zu stimulierten und unstimulierten Neuronen-Monokulturen verringert. Eine Wirkung, die bei längerer direkter Kokultivierung (24 Stunden) von DRG-Neuronen auf BMDM beobachtet wurde, war eine Steigerung der Proliferationsrate der Makrophagen. Die Proliferationsrate scheint unter anderem von (membrangebundenen) TNF- α abhängig zu sein, da der TNFR1-Antagonist den Proliferations-steigernden Effekt in direkter Kokultur zum Teil wieder aufhob.

Überträgt man die *in vitro* gewonnenen Daten auf das Szenario der in die lumbalen DRGs immigrierten Makrophagen in der akuten Phase der AIA von Mäusen und Ratten, so sind verschiedene Neuro-Immun-Interaktionen möglich. Neurone könnten sowohl den Aktivitätsstatus wie auch die Anzahl der Makrophagen über die Produktion von Mediatoren, wie *in vitro* am Beispiel von TNF- α gezeigt wurde, beeinflussen. Abhängig von ihrem Aktivierungsstatus haben die Makrophagen im DRG das Potential die Vitalität und Aktivität der Neurone zu modulieren. Der Vergleich der Expression von den Aktivierungsmarkern Arg1, COX-2, iNOS und IL-6 der Makrophagen *in vivo* und *in vitro* zeigte, dass die DRG-immigrierten Makrophagen am ehesten den TNF- α -stimulierten BMDM *in vitro* entsprechen. *In vivo* konnte eine Markierung der Makrophagen mit anti-IL-6 und anti-Arg1 gezeigt

werden. Sie waren hingegen negativ für COX-2 und iNOS. *In vitro* konnte dargestellt werden, dass iNOS nur in LPS/IFN- γ -stimulierten M1-Makrophagen exprimiert wurde und dass IL-4-stimulierte M2-Makrophagen nur Arg1, aber kein IL-6 exprimierten. Folglich handelte es sich um „friedliche“, aber proinflammatorische TNF- α -stimulierte M1-Makrophagen in den DRGs. Es konnte in einem weiteren *in vitro* Versuch gezeigt werden, dass die Zugabe von IL-6, das potentiell von Makrophagen in den DRGs freigesetzt wird, die CGRP-Freisetzung in Neuronen-Monokulturen stimulierte, allerdings nur bei Kostimulation mit KCl und verstärkt unter Beigabe des löslichen IL-6 Rezeptors (soluble IL-6 receptor = sIL-6R). DRG-immigrierte Makrophagen wirken nicht neurotoxisch, besitzen jedoch das Potential Neurone zu stimulieren und, verbunden damit, pronozizeptiv zu wirken.



Schematische Zusammenfassung der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse über die Interaktion von BMDM und DRG-Neuronen *in vitro* und der Charakterisierung der DRG-immigrierten Makrophagen bei der AIA.

Dabei wurden die im Kokultursystem gewonnenen Ergebnisse auf die potentielle Interaktion von Makrophagen und DRG-Neuronen während der AIA übertragen und mit den bereits existierenden Theorien über die TNF- α -vermittelte Einwanderung der Makrophagen in die DRGs in Zusammenhang gebracht. 1. Es wurde ein Kokultursystem etabliert, um die verschiedenen Interaktionen von BMDM und DRG-Neuronen zu untersuchen. 2. Von Makrophagen produziertes IL-6 förderte die neuronale CGRP-Freisetzung. Daraus folgt die Hypothese, dass Makrophagen zur Entstehung der mechanischen Hyperalgesie im Verlauf der AIA beitragen könnten. 3. DRG-Neurone können die Proliferation von BMDM *in vitro* erhöhen. Daraus entsteht die Frage, ob dieser proliferationsfördernde Effekt auf die Makrophagen auch im DRG während der AIA eine Rolle spielen könnte. 4. Während der AIA infiltrieren TNF- α -aktivierte M1-Makrophagen die lumbalen DRGs der Ratte. Sie exprimieren IL-6, Arg1, aber sind negativ für iNOS.

1 Einleitung

1.1 Makrophagen

1.2.1 Funktion bei der angeborenen und adaptiven Immunität

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Abwehr von Pathogenen. Im Rahmen der angeborenen Immunität phagozytieren Makrophagen komplette Pathogene, die sie über allgemeine Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern = PAMP) erkennen. Ein Beispiel wären Lipopolysaccharide (LPS), die in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien enthalten sind und die von Makrophagen über den toll-like receptor 4 (TLR4) gebunden werden. Makrophagen, die durch solche PAMPs aktiviert werden, unterstützen den Entzündungsprozess indem sie über die Produktion von Zytokinen wie Interleukin (IL)-8, IL-12 oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α weitere Immunzellen anlocken (Janeway et al., 2002). Zudem sezernieren Makrophagen IL-6, das die Proliferation und Antikörperproduktion von B-Zellen fördert (Maeda et al., 2010) und die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen stimuliert (Rincon et al., 1997). Nach der Aufnahme und dem Abbau von Pathogenen werden die prozessierten Antigene auf major histocompatibility complex (MHC)-Klasse-II-Molekülen an der Makrophagenoberfläche zu T-Zellen präsentiert. Die Bindung der präsentierten Antigene erfolgt über den T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor = TCR) und benötigt für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen noch die Interaktion ihres cluster of differentiation (CD) 40 Rezeptors mit dem CD40 Liganden der Makrophagen. Die Aktivierung von T-Zellen initiiert die adaptive Immunantwort.

Im Rahmen der adaptiven Immunität phagozytieren Makrophagen von B-Zellen opsonierte (= zum Abbau markierte) Pathogene, die sie über ihre Fc-Rezeptoren erkennen (Janeway et al., 2002). Die Produktion von zytotoxischen Mediatoren ist eine weitere wichtige Effektorfunktion von Makrophagen zur Lyse extrazellulärer Pathogene, aber sie dient auch der lokalen Gewebeerstörung um einen Infektionsherd zugänglich zu machen. Typische zytotoxische Makrophagenprodukte sind Hydrolasen, Lysozym, Matrix-Metalloproteasen, H_2O_2 oder NO. Makrophagen übernehmen, abhängig von ihrem Aktivierungszustand, nicht nur proinflammatorische oder zytotoxische Funktionen, sondern haben auch wichtige Aufgaben bei der Wundheilung und der Auflösung von Entzündungen. In diesem Zusammenhang vermitteln Makrophagen den Umbau von Geweben und sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 (Janeway et al., 2002). Über IL-10 wird die Produktion von T-Helfer1 (T_H1)-Zell Zytokinen gehemmt (Mosmann and Moore, 1991), die

MHC-Klasse-II-Expression von antigenpräsentierenden Zellen reduziert (Malefyt et al., 1991b) und die Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β ; IL-6; TNF- α) durch Makrophagen und Monozyten inhibiert (Malefyt et al., 1991a).

1.2.2 Entwicklung und Aktivierung von Makrophagen

Makrophagen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des roten Knochenmarks. Dort entwickeln sie sich über mehrere Vorläuferstadien zu Monozyten, die dann das Knochenmark über die Blutbahn verlassen. Für die Differenzierung von Monozyten und Makrophagen ist der Makrophagenkolonien-stimulierende Faktor (macrophage colony-stimulating factor = M-CSF) von zentraler Bedeutung (Umeda et al., 1996). Monozyten zirkulieren im Blut bis sie über spezifische Signale ins Gewebe gelockt werden und sich dort zu Gewebsmakrophagen entwickeln (siehe Abb.1). Die Einwanderung ins Gewebe (Diapedese) wird über die Bindung der Monozyten an Adhäsionsmoleküle des Endothels wie z.B. das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule = V-CAM) vermittelt (Osborn et al., 1989). Ruhende Gewebsmakrophagen produzieren fast keine Zytokine oder Toxine. Ohne Stimulation durch PAMPs präsentieren sie keine Antigene (Pai et al., 2002), aber besitzen eine hohe Phagozytose- und Proliferationsrate (Yeramian et al., 2006).

Makrophagen zeigen gewebsspezifisch große Unterschiede in ihrer Rezeptorexpression, Zytokinproduktion und den Funktionen, die sie übernehmen. Beispiele für verschiedene residente Makrophagentypen sind die Kupfferzellen der Leber, die Mikrogliazellen des Zentralnervensystems und die Osteoklasten des Knochens (Janeway et al., 2002).

Eine weitere Klassifizierung teilt Makrophagen nach ihrem Aktivierungszustand in M1- und M2-Makrophagen ein (siehe Abb.1). M1-Makrophagen werden über T_H1-Zytokine aktiviert (Munder et al., 1999; Mills et al., 2000) und wirken proinflammatorisch (Qin et al., 2012). M1-Makrophagen können nochmals in LPS/Interferon (IFN)- γ -stimulierte (klassisch aktivierte) und TNF- α -stimulierte Makrophagen unterteilt werden. Beide Typen übernehmen wichtige Aufgaben bei der Abwehr von Pathogenen. Im Unterschied zu ruhenden Gewebsmakrophagen zeigen M1-Makrophagen eine hohe MHC-Klasse-II-Expression (Pai et al., 2002), die sie befähigt Antigene zu T-Zellen zu präsentieren. Charakteristisch für M1-Makrophagen ist die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-1 β und TNF- α (Qin et al., 2012). Im Gegensatz zu TNF- α -stimulierten Makrophagen sezernieren LPS/INF- γ -stimulierte Makrophagen zytotoxische Produkte. Zum Beispiel aktiviert LPS die induzierbare

NO Synthase (iNOS), die große Mengen NO zur Lyse von Pathogenen freisetzt (Ding et al., 1988). TNF- α -stimulierte Makrophagen exprimieren iNOS hingegen nicht, aber stattdessen Arginase 1 (Arg1). Beide Enzyme konkurrieren um das Substrat Arginin (Tenu et al., 1999). Arg1 katalysiert die Hydrolyse von Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. L-Ornithin zerfällt anschließend zu Prolin und Polyaminen. Proline fördern die Zellproliferation, was eine Erklärung dafür sein könnte, warum iNOS-aktive M1-Makrophagen im Gegensatz zu Arg1-aktiven M1- und M2-Makrophagen nicht proliferieren (Yeramian et al., 2006). Die Entwicklung zu M2-Makrophagen oder alternativ aktivierten Makrophagen wird über das von T_H2-Zellen produzierte Zytokin IL-4 induziert. Abgesehen von Arg1 (Munder et al., 1999; Mills et al., 2000) exprimieren sie antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-10 (Porta et al., 2009). Alternativ aktivierte Makrophagen übernehmen eine wichtige Funktion bei der Beendigung von Entzündungen, der Angiogenese (Jetten et al., 2014) und der Wundheilung (Mirza et al., 2009). Makrophagen können somit abhängig von ihrem Aktivierungszustand maßgeblich die Pathogenese von Krankheiten vorantreiben oder dieser entgegen wirken.

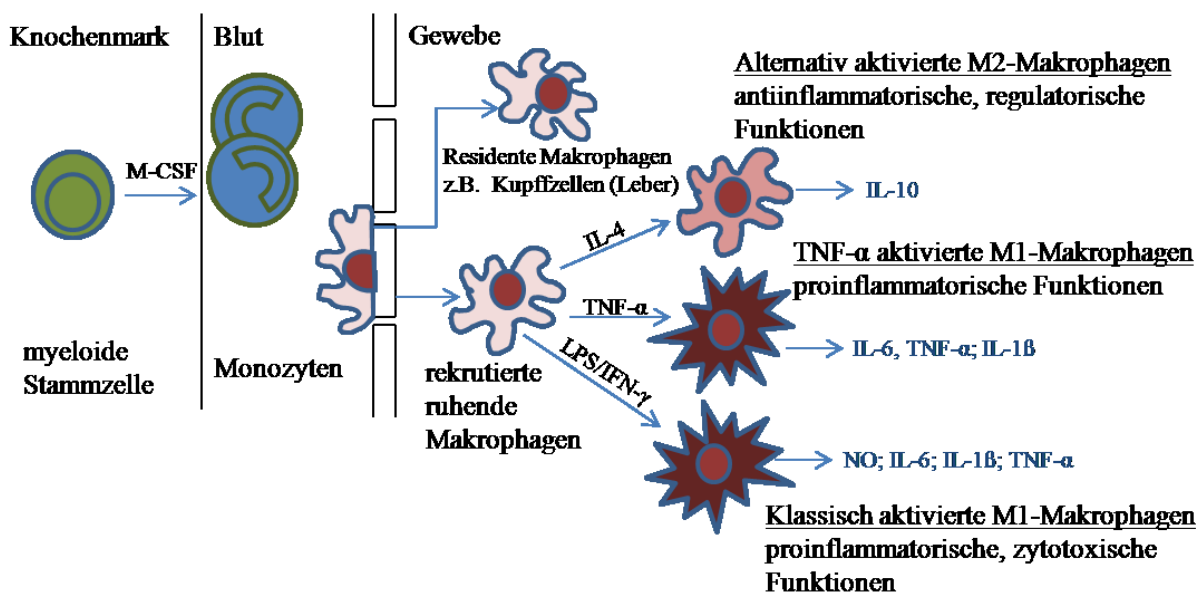


Abbildung 1 Schematische Übersicht zur Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen

Myeloide Stammzellen des Knochenmarks benötigen M-CSF um zu Monozyten zu differenzieren. Residente Makrophagen wie z.B. Kupffern Zellen (Leber) wandern direkt nach der Reifung in ihr Zielgewebe. Alle anderen Monozyten zirkulieren im Blutkreislauf bis sie über Chemokine oder Zytokine ins Gewebe rekrutiert werden. Die Aktivierung der Makrophagen im Gewebe ist abhängig vom Mikromilieu. IL-4 stimuliert die Entwicklung zu M2-Makrophagen. Klassisch aktivierte M1-Makrophagen werden über LPS/IFN- γ induziert und ein Subtyp von M1-Makrophagen ist abhängig von einer TNF- α -Stimulation. Die drei verschiedenen Aktivitätstypen besitzen verschiedene Funktionen im Gewebe. Die Illustration wurde in Anlehnung an Gordon (2003) erstellt.

1.2 Schmerz und Nozizeption

Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das vor allem dazu dient Schutzreaktionen des Körpers zu induzieren. Bei der physiologischen Art der Schmerzentstehung wirken potentiell gewebeschädigende Reize (Noxen; noxische Reize) auf gesundes Gewebe ein. Beim Entzündungsschmerz hingegen führt die Aktivierung von Immunzellen zu einer Ausschüttung von Mediatoren, die sensorische Nervenendigungen für Noxen sensibilisieren. Vor allem in der akuten Phase von Entzündungserkrankungen dient der Schmerz dem Ruhigstellen und somit der Heilung von erkrankten Geweben. Neuropathischer Schmerz entsteht durch die Schädigung von Nervenfasern. Dies kann in Form einer Durchtrennung oder Quetschung von Nervenfasern geschehen oder eine Folge von degenerativen Nervenerkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose sein. Der entstehende Schmerz ist zum Teil unabhängig von noxischen Reizen. Er kann durch spontane Aktionspotentiale (ektopische Entladungen) vermittelt werden, wobei auch Entzündungsmediatoren von Immunzellen eine Depolarisation verursachen können. Unabhängig von der Art der Schmerzentwicklung kann es zur Entstehung einer Allodynie und Hyperalgesie kommen. Allodynie bedeutet, dass sonst nicht schmerzhaft Reize sich schmerzhaft anfühlen. Im Unterschied dazu werden bei der Hyperalgesie noxische Reize als noch schmerzhafter empfunden. Bei der primären Hyperalgesie ist die Schmerzschwelle direkt am verletzten oder entzündeten Ort abgesenkt, während bei der sekundären Hyperalgesie der umgebende Bereich eine erhöhte Empfindlichkeit aufweist.

Schmerz ist ein subjektives Erlebnis von Nozizeption. Unter Nozizeption versteht man die Aufnahme (Transduktion), Weiterleitung (Transmission) und Verarbeitung thermischer, mechanischer oder chemischer Noxen über das Nervensystem (siehe Abb.2). Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen in peripheren Geweben, die noxische Reize in ihrem rezeptiven Feld aufnehmen und diese in elektrische Potentiale übersetzen. Ein Nozizeptor ist meist über mechanisch, thermisch und chemisch noxische Reize erregbar (polymodal). Nur wenige Nozizeptoren sind nur durch eine Reizart erregbar (monomodal) wie z.B. die Untergruppe der Mechanonozizeptoren. Die Fortleitung der Aktionspotentiale verläuft über unmyelinisierte C-Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit unter 2,5 m/s oder über dünn myelinisierte A δ -Fasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit zwischen 2,5 bis 30 m/s zu den Zellkörpern der sensorischen Neurone im Hinterwurzelganglion (dorsal root ganglion = DRG). DRGs sind Ansammlungen von Zellkörpern pseudo-unipolarer Neurone, die über ihre Axone u.a. Noxen aus der Peripherie aufnehmen und bis ins Rückenmark weiterleiten. Sie sind im Wirbelkanal

jedes Rückenmarksegmentes paarig lokalisiert und versorgen segmentbezogen sensorisch die Peripherie. DRGs enthalten neben den kleineren Zellkörpern der C- und A δ -Fasern auch größere der nicht-nozizeptiven A α - und A β -Fasern. Die Somata sind von Satellitenzellen umgeben, die wichtig für die Versorgung und Funktion der DRG-Neurone sind. Im Hinterhorn des Rückenmarks erfolgt eine erste synaptische Übertragung des nozizeptiven Signals von DRG-Neuronen über die Ausschüttung des erregenden Neurotransmitters Glutamat auf spinale Neurone. Erwähnenswert ist, dass die Signalübertragung an Synapsen über die Freisetzung der erregenden Neuropeptide Substanz P und dem calcitonin gene related peptide (CGRP) verstärkt wird (Ryu et al., 1988; Kangrga et al., 1990).

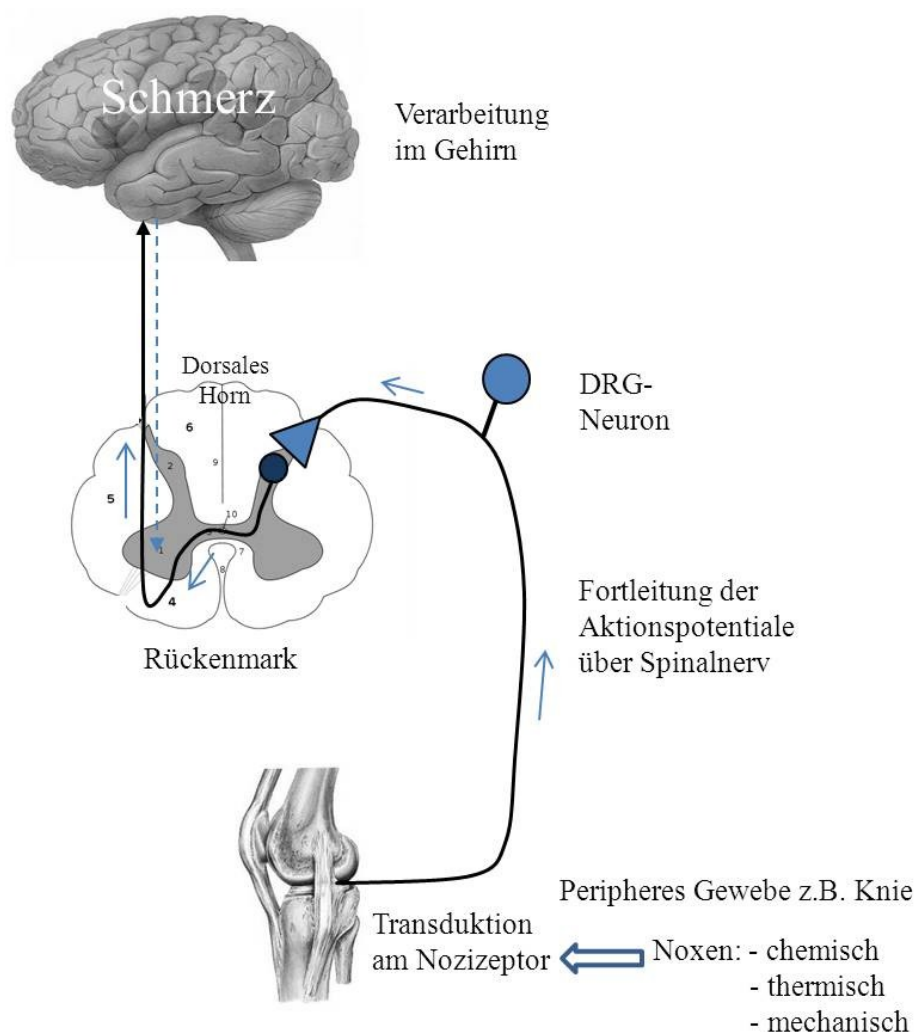


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Prozesses der Nozizeption

In den peripheren Geweben (z.B. Knie) werden noxische Reize an den sensorischen Nozizeptorendigungen aufgenommen (Transduktion) und in Aktionspotentiale umgewandelt (Transmission). Die Weiterleitung der Aktionspotentiale erfolgt über das Axon im Spinalnerv bis zum Soma, das im DRG lokalisiert ist und dann über das proximale Axon ins Rückenmark, wo die 1. synaptische Umschaltung stattfindet. Durch aufsteigende Bahnen wird die nozizeptive Information ins Gehirn geleitet. Im Gehirn erfolgt die Verarbeitung des nozizeptiven Signals, das folglich als Schmerz wahrgenommen wird.

Auf die weitere Übertragung des nozizeptiven Reizes über das Rückenmark bis zum Gehirn, dem Ort der nozizeptiven Verarbeitung, wird an dieser Stelle nicht eingegangen. Im Folgenden sollen periphere Mechanismen der Schmerzentstehung im Fokus stehen.

1.3 Periphere Mechanismen der Nozizeption

1.3.1 Nozizeptoren

Nozizeptoren sind hochschwellige Rezeptoren, die im gesunden Gewebe nur durch noxische Reize erregt werden können. Die Transduktion von Noxen wird abhängig von dem Stimulus über spezifische Kationenkanäle vermittelt. An der Generierung und der Weiterleitung von Aktionspotentialen sind vor allem spannungsgesteuerte Kationenkanäle wie Natrium-, Kalium- und Calciumkanäle beteiligt. Am besten untersucht ist der Rezeptor für die Aufnahme thermischer Noxen. Der transient receptor potential vanilloid-1 receptor (TRPV1-Rezeptor) ist ein unselektiver Kationenkanal, der in nozizeptiven Fasern exprimiert wird und der sich bei Einwirkung noxischer Hitze ($>43^{\circ}\text{C}$) öffnet. Der TRPV1-Rezeptor wird auch über Capsaicin, einen Inhaltsstoff des Pfeffers, stimuliert. Der TRPV1-Agonist Capsaicin wurde in vielen Studien zur Untersuchung der zellulären Mechanismen, die zur Entstehung des Hitzeschmerzes führen, genutzt (Zhang et al., 2005; Tang et al., 2008). Der Rezeptor zur Vermittlung mechanischer Noxen ist nicht sicher bekannt. Studien mit TRPV4-knockout-Tieren zeigten, dass der Kationenkanal TRPV4 für die Aufnahme von mechanischen Noxen von Bedeutung ist (Chen et al., 2007; Alessandri-Haber et al., 2008). Nozizeptoren sind für einige noxisch chemische Reize empfänglich. Zum Beispiel der pH-sensitive Kanal acid sensing ion channel (ASIC) vermittelt nach Bindung von Protonen einen Einstrom von Natriumionen (Lefler et al., 2006).

1.3.2 Schmerz als ein Ergebnis von Neuro-Immun-Interaktionen

Im Rahmen einer Entzündung oder einer Gewebsverletzung kann es durch die Sensibilisierung von Nozizeptoren oder durch die Rekrutierung stummer Nozizeptoren zur Entstehung von Allodynie bzw. Hyperalgesie kommen (Handwerker et al., 1991). Die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren wird durch eine Reihe von Mediatoren vermittelt, die vor allem von einwandernden Immunzellen oder umliegenden Gewebezellen (Epithelzellen, Synovialzellen) produziert werden. Primäre nozizeptive Afferenzen besitzen

spezifische Rezeptoren für klassische Entzündungsmediatoren (Prostaglandin, Bradykinin, Histamin), Neurotrophine (nerve growth factor = NGF; brain-derived neurotrophic factor = BDNF), Neuropeptide (CGRP (Von Banchet et al., 2002) Substanz P) und Zytokine. Besonders die Wirkung von Zytokinen auf die Nozizeption steht im Fokus aktueller Forschung (Shen et al., 2013). Weitere Mediatoren, die zur Sensibilisierung sensorischer Nervenendigungen beitragen, sind Hormone wie Adrenalin und Nukleotide wie ATP. Die Bindung der genannten Mediatoren an ihre Rezeptoren führt zur Induktion verschiedener Signalkaskaden, die die Expression oder Leitfähigkeit von Ionenkanälen beeinflussen (siehe Abb. 3) und somit letztendlich die Generierung von Aktionspotentialen steuern. Zum Beispiel wurde an kultivierten DRG-Neuronen gezeigt, dass CGRP den Einstrom von Natrium über spannungsgesteuerte Natriumkanäle erhöhte (Natura et al., 2005). Die Langzeit-Inkubation von kultivierten DRG-Neuronen mit $\text{TNF-}\alpha$ induzierte eine gesteigerte Expression des TRPV1-Rezeptors (Hensellek et al., 2007).

Makrophagen sind mit die ersten Immunzellen, die verletztes Gewebe in großer Anzahl infiltrieren, und die von ihnen freigesetzten Mediatoren (z.B. Zytokine) dominieren den Entzündungsort. Davon abgesehen, dass Makrophagen wichtige Aufgaben bei der Anlockung und Aktivierung weiterer Immunzellen erfüllen, produzieren sie eine Reihe von Mediatoren, für die die Neurone Rezeptoren besitzen. Somit überrascht es nicht, dass es Indizien für eine direkte Beeinflussung der Nozizeption durch Makrophagenprodukte gibt. Zum Beispiel verminderte die Injektion von IL-6 ins Kniegelenk die Erregungsschwelle des Nozizeptors für noxische und nicht-noxische Reize (Brenn et al., 2007). Auch IL-1 β , ein weiteres proinflammatorisches Zytokin, das von M1-Makrophagen produziert wird, kann Neurone aktivieren. Eine Studie von Hou et al. (2003) zeigt eine Aktivierung von DRG-Neuronen über IL-1 β , gemessen an der Freisetzung von CGRP. Im Gegensatz zum proinflammatorischen $\text{TNF-}\alpha$, das die Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen von DRG-Neuronen erhöhte, bewirkte die Zugabe des antiinflammatorischen IL-10 eine Absenkung der Natriumkanal-Expression (Shen et al., 2013). Proinflammatorische Zytokine wirken nicht nur pronozizeptiv, die Zugabe von IL-6 zeigte auch eine proregenerative Wirkung auf den Auswuchs neuronaler Ausläufer (Schafer et al., 1999). Makrophagen können abhängig von ihrem Aktivierungszustand zudem neurotoxisch wirken. Dies zeigt eine Studie von Flavin et al. (1997), in der Überstände von LPS-stimulierten Makrophagen eine Apoptose von Neuronen des zentralen Nervensystems verursachten. Die Wirkung von Makrophagen auf Neurone ist potentiell vielseitig und ist vor allem von einem proinflammatorischen oder antiinflammatorischen Milieu abhängig.

Neurone sezernieren wiederum eine Reihe von Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Neuropeptide, die die Aktivierung und Migration von Immunzellen regulieren und somit den Entzündungsverlauf beeinflussen können. Die Neuropeptide CGRP und Substanz P sind zentrale Mediatoren der neurogenen Entzündung (Pedersenbjergaard et al., 1991), die die Durchlässigkeit von Gefäßen erhöhen (Louis et al., 1989) und die Aktivität von Immunzellen beeinflussen. Substanz P und CGRP können Makrophagen zur Produktion von TNF- α und IL-1 β stimulieren. Die Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wurde an einem in vitro Model Herpes-simplex-Virus-infizierter peritonealer Makrophagen gezeigt (Yaraee et al., 2003). Im Gegensatz dazu bewirkte CGRP eine Inhibierung der LPS-induzierten TNF- α -Produktion peritonealer Makrophagen (Feng et al., 1997). Makrophagen exprimieren die tropomyosin-receptor-kinase A (TrkA), die u.a. den Rezeptor für NGF darstellt. Eine Studie von Gilad et al. (1995) zeigt, dass NGF Makrophagen chemotaktisch anlockt. Zudem kann NGF die Aktivierung von Makrophagen stimulieren, gemessen an einer erhöhten TNF- α -Sekretion peritonealer Makrophagen nach NGF-Zugabe (Barouch et al., 2001). Neurone scheinen abhängig von dem pathologischen Zustand das Verhalten von Makrophagen lenken zu können. Es gibt einige Studien, die eine Infiltration von Makrophagen an neuropathische Nervenendigungen zeigen (Conti et al., 2002; Peters et al., 2007) und vermutlich wird die Migration direkt von neuronalen Faktoren gesteuert. Da die Interaktionsmöglichkeiten zwischen Makrophagen und Neuronen so vielfältig sein können, ist es zum Verständnis der Pathogenese einiger Krankheiten wichtig, den Modus der jeweiligen Wechselwirkung zu analysieren.

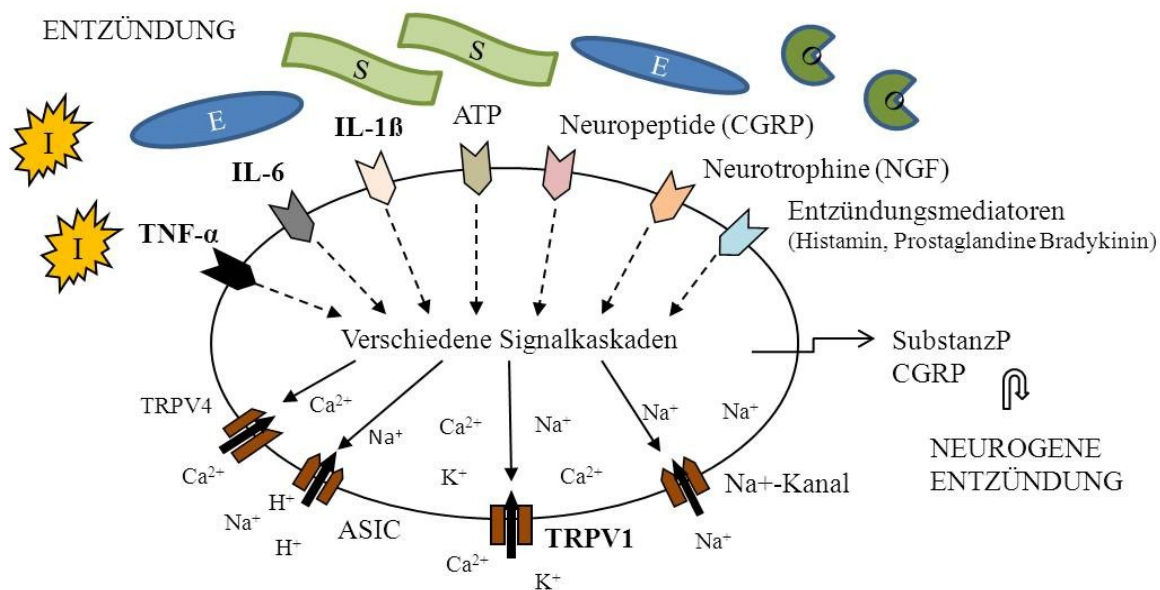


Abbildung 3 Darstellung einer sensorischen Nozizeptorendigung umgeben von Immunzellen (I), Epithelzellen (E), Synoviozyten (S), Osteoklasten (O) und von Mediatoren, die von diesen Zellen stammen. Nozizeptoren besitzen Rezeptoren für Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β), ATP, Neuropeptide (CGRP, Substanz P), Neurotrophine (NGF) und für klassische Entzündungsmediatoren (Histamin, Prostaglandine, Bradykinin). Die Bindung dieser Substanzen in Folge einer Entzündung oder Gewebeverletzung bewirkt die Aktivierung neuronaler Signalkaskaden, die dann zur Regulation von Ionenkanälen führt. Kationenkanäle wie TRPV1, TRPV4, ASICs oder verschiedene Natriumkanäle sind wichtig für die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen.

1.4 Die rheumatoide Arthritis

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine häufig auftretende chronische Entzündungskrankheit der Gelenke, die auch systemische Auswirkung hat. Die Ursache der RA ist nicht geklärt, doch scheint sie sich aus einem Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zu entwickeln (McInnes and Schett, 2011).

Bereits vor dem Ausbruch der Krankheit können im Blut vieler Betroffener Autoantikörper nachgewiesen werden, die eine zentrale Rolle bei der Initiierung der fehlgeleiteten Immunreaktion zu spielen scheinen. Dabei handelt es sich um den so genannten Rheumafaktor, ein Autoantikörper gegen den Fc-Teil von Antikörpern (Olsen and Jasin, 1985), und um Autoantikörper gegen citrullinierte körpereigene Proteine (Kroot et al., 2000; van Boekel et al., 2002). Die Entstehung dieser Autoantikörper ist nicht gänzlich geklärt, aber sie scheint durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Prädispositionen und Umweltfaktoren verursacht zu sein. In einer Studie von Makrygiannakis (2008) wird gezeigt, dass Rauchen die Citrullinierung von Proteinen fördert. Durch Citrullinierung modifizierte Proteine werden vom Immunsystem als fremd erkannt und induzieren somit eine adaptive

Immunantwort. Es wurde auch ein Zusammenhang zwischen Bakterien, die Parodontitis verursachen (Wegner et al., 2010) sowie Mikroorganismen des Darms (Eerola et al., 1994) und der Bildung von Autoantikörpern festgestellt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Mikroorganismen durch molekulare Mimikry menschlicher Proteine die Fehlerkennung von körpereigenen Antigenen begünstigen. Genanalysen zeigen, dass die RA im Zusammenhang mit genetischen Varianten immunregulatorischer Faktoren zu stehen scheint (McInnes and Schett, 2011). Die Empfänglichkeit für die RA wird durch bestimmte Varianten von Genen, die in Zusammenhang mit T-Zell-Selektion, Antigenpräsentation und Zytokinwirkung stehen, begünstigt (van der Helm-van Mil et al., 2005).

Die Autoimmunreaktion in der RA verläuft systemisch, jedoch kommt es v.a. in den Gelenken der Betroffenen zur Ablagerung von Immunkomplexen und zur Entstehung einer Entzündung. Es wurde noch nicht geklärt, wieso sich die Entzündung auf das Gelenk konzentriert. Mögliche Faktoren könnten der niedrige Sauerstoffpartialdruck und die hohe biomechanische Belastung der Gelenke sein (McInnes and Schett, 2011). Die Entzündung des Gelenks ist gekennzeichnet durch eine massive Einwanderung von Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, autoreaktive T_H1 -Zellen, T_H17 -Zellen, u.a.). Makrophagen stellen die Überzahl der immigrierten Immunzellen dar und sind zentral für die Pathogenese der RA (Mulherin et al., 1996). Über die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie $TNF-\alpha$ und $IL-1\beta$ aktivieren Makrophagen Endothelzellen und synoviale Fibroblasten, was zur synovialen Hyperplasie (Pannusbildung) führt. Zudem fördern Makrophagen die Gewebeerstörung durch die Produktion von Matrixmetalloproteasen und reaktiven Sauerstoffspezies sowie über die Aktivierung von Osteoklasten (Kinne et al., 2000). Eine Studie von Mulherin et al. (1996) zeigt, dass der Grad der Gelenkzerstörung mit der Anzahl der Makrophagen im Gelenk korreliert. Im Tiermodell verringerte die systemische Depletion der Makrophagen die Stärke der Entzündung und die Schwere der Gelenkzerstörung (Richards et al., 1999). Die akute Phase der RA ist durch die Pannusbildung charakterisiert, die später in der chronischen Phase zu einer Schädigung des Knochen- und Knorpelgewebes bis zum Funktionsverlust der Gelenke führt. Neben den lokalen Symptomen in den Gelenken zeigen sich im Verlauf der RA auch systemische Folgen, wie eine erhöhte Empfänglichkeit für Gefäß- und Herzerkrankungen (Peters et al., 2010), Osteoporose (Guler-Yuksel et al., 2009) und Lymphome (Baecklund et al., 2003).

Des Weiteren stellt die Entstehung von Schmerzen ein großes Problem für Rheumapatienten dar. Einige Indizien deuten darauf hin, dass Makrophagen und die von ihnen sezernierten

Zytokine direkt zur Entstehung des arthritischen Schmerzes beitragen. Eine Studie von Boettger et al. (2008) zeigt am Tiermodell, dass TNF- α direkt Hyperalgesie vermitteln kann. Und auch bei der RA des Menschen scheint TNF- α eine zentrale pronozizeptive Rolle zu spielen, denn die Gabe des TNF- α Inhibitors Etanercept bewirkte eine Verringerung des wahrgenommenen Schmerzes (Hess et al., 2011).

1.5 Das AIA-Modell

Die Antigen-induzierte Arthritis (AIA), ein Modell der rheumatoiden Arthritis, wurde bereits 1977 (Brackertz et al.) bei dem Mausstamm C57BL etabliert und findet heute zudem häufig bei der Ratte Anwendung. Die AIA wird über eine fehlgeleitete humorale Immunantwort vermittelt, die auf der mehrmaligen subkutanen Immunisierung mit methyliertem bovines Serumalbumin (mBSA) beruht. Durch gleichzeitige Applikation von hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* in Form des Freund's Adjuvans (CFA = complete Freund's adjuvant) und der intraperitonealen Injektion von hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis* wird die Immunreaktion verstärkt. Die Auslösung der AIA erfolgt durch Injektion des Antigens mBSA in ein Knie des immunisierten Tieres, sodass eine Monoarthritis mit einer Inzidenz von 100% entsteht. Eine Arbeit von Brackertz et al. (1977b) zeigt, dass die AIA hauptsächlich über T-Zellen vermittelt wird. Die akute Phase der Krankheit (Tag 0 – Tag 7) ist gekennzeichnet durch Anschwellung und Schmerzen im entzündeten Gelenk. Die Ablagerung von Immunkomplexen im Gelenk führt zu einer Einwanderung und Aktivierung von Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, Granulozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen, und parallel zur Entstehung von mechanischer und thermischer Hyperalgesie. Die übermäßige Proliferation (Hyperplasie) von Synoviozyten und die Bildung eines Pannus führen v.a. in der chronischen Phase (Tag 7 bis Tag 21) zu einem Knochen- und Knorpelabbau. Diese histologischen Veränderungen entsprechen den Veränderungen, die im Gelenk eines Patienten mit rheumatoider Arthritis auftreten, mit dem Unterschied, dass die chronische Phase beim Menschen stärker ausgeprägt ist als in der AIA (Brackertz et al., 1977a). Die Entstehung der AIA wird maßgeblich durch Makrophagen und Makrophagenprodukte vorangetrieben. Dies wurde durch die gezielte Depletion von Makrophagen über Clodronat-Liposomen gezeigt, welche eine Reduktion der Knieschwellung und einen verminderten Knochen- und Knorpelabbau bewirkte (Richards et al., 1999). In IL-6-knockout-Tieren entwickelte sich eine mildere Form der AIA mit verringerten Gelenkschäden (Ohshima et al., 1998). Erste Hinweise zeigen, dass Makrophagen nicht nur

den entzündungsbedingten Knochenabbau im Gelenk vermitteln, sondern zudem eine wichtige Rolle bei der Schmerzentstehung im Rahmen der AIA spielen. In einer Studie von Segond von Banchet et al. (2009) wurde erstmals eine bilaterale Infiltration von Makrophagen in die DRGs, die auch die Kniegelenke versorgen, demonstriert. Interessanterweise bewirkte die Neutralisation von TNF- α eine bilaterale Verringerung der Makrophagenanzahl im DRG und parallel dazu auch bilateral eine verminderte mechanische Hyperalgesie. Bei der AIA wird die Entzündung nur in einem Gelenk induziert, sodass sich die Vermutung aufdrängt, Makrophagen könnten eine zentrale Rolle bei der bilateralen peripheren Sensibilisierung von Nozizeptoren spielen. Die segmentale Spezifität der Makrophageneinwanderung während der AIA in die lumbalen DRGs wirft die Frage auf, ob Neurone auch das Verhalten der Makrophagen steuern können.

1.6 Ziele der Arbeit

1. Ein Ziel war die Etablierung eines *in vitro* Kokultur-Modells zwischen BMDM und DRG-Neuronen um isoliert die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten der beiden Zelltypen untersuchen zu können.
2. Es sollte die Wirkung von verschieden aktivierten BMDM auf die Vitalität und Aktivität der DRG-Neurone in Kokultur getestet werden. Zur Untersuchung der neuronalen Vitalität sollte ein Test mit Trypanblau durchgeführt werden und die Aktivität von DRG-Neuronen sollte über die Freisetzung des Neuropeptids CGRP gemessen werden.
3. Ein weiteres Ziel war es die Wirkung von DRG-Neuronen auf Makrophagen zu untersuchen. Dies sollte über die Analyse der Proliferation sowie der NO- und Zytokinproduktion der Makrophagen im Kokultursystem im Vergleich zur Monokultur erfolgen.
4. Es sollte der Makrophagentyp charakterisiert werden, der in die DRGs während der AIA immigriert um dann Rückschlüsse auf die Funktion der Makrophagen und eine mögliche Bedeutung ihrer Einwanderung bei der Entstehung der Hyperalgesie ziehen

zu können. Als anerkannte Marker zur Unterscheidung von M1- und M2-Makrophagen wurden Antikörper für iNOS, Arg1, COX-2 und IL-6 ausgewählt.

5. Da Makrophagen bei der adaptiven Immunantwort viele Aufgaben in Kooperation mit T-Zellen erfüllen, sollte geprüft werden, ob auch T-Zellen in die DRGs von AIA-induzierten Ratten infiltrieren.

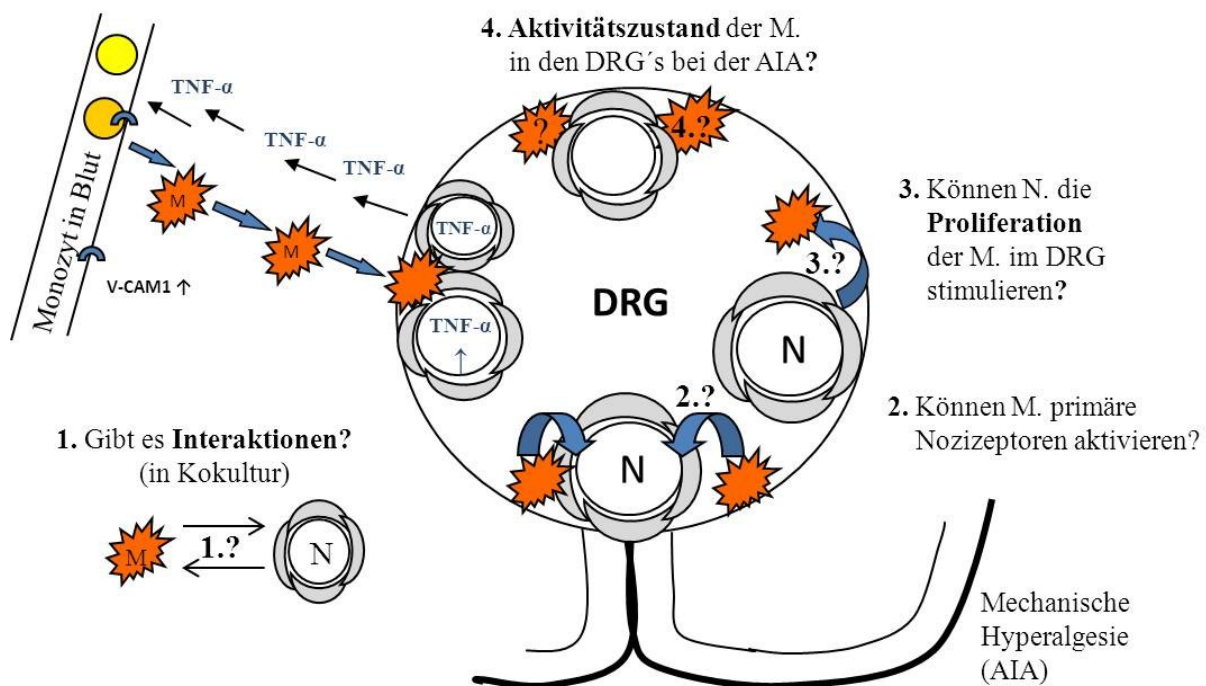


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Invasion von Makrophagen ins DRG mit dem Ziel die Fragestellungen und Hypothesen, die in dieser Arbeit verfolgt wurden zu illustrieren.

[N = Neurone; M = Makrophagen] 1. Um die Frage zu beantworten, ob es Interaktionen zwischen Makrophagen und DRG-Neuronen gibt, sollte ein Kokultursystem etabliert werden. 2. Es sollte die Hypothese untersucht werden, dass DRG-immigrierte Makrophagen Neurone aktivieren können. 3. Es sollte im Kokultur-Modell untersucht werden, ob DRG-Neurone die Proliferation von Makrophagen beeinflussen können. 4. Es sollte der Phänotyp der Makrophagen im DRG von AIA-induzierten Ratten analysiert werden.

2. Methoden und Materialien

2.1 Versuchstiere

Für die Präparation muriner DRG-Neurone und BMDM dienten männliche und weibliche, adulte, ca. 12 bis 14 Wochen alte Wildtypmäuse vom Stamm C57BL/6. Zum Vergleich der Charakteristika von Maus-BMDM mit Ratten-BMDM wurden männliche, adulte Ratten (12 bis 15 Wochen) vom Wistar-Stamm genutzt. Zur histologischen Analyse von Veränderungen in den DRGs nach Induktion einer AIA wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 und weibliche Ratten des Stammes Lewis (6 bis 8 Wochen alt) genutzt. Lewis-Ratten entwickeln mit einer Inzidenz von 100% eine AIA. Alle Versuchstiere wurden im Tierhaus Nonnenplan (Jena) unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus; Futter und Wasser ad libitum) gehalten. Die Tierversuche wurden von der Thüringer Landesregierung genehmigt (Reg.NO 02-004/06)

2.2 Primäre Zellkulturen

2.2.1 Vorbereitung von Verbrauchsmaterialien für die Zellkultivierung

2.2.1.1 Beschichtung von Glas-Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Neurone können nicht an Glas adhären, sondern benötigen eine Poly-L-Lysin-Schicht auf den Glasplättchen ($d = 13 \text{ mm}$). Makrophagen können sowohl mit als auch ohne Beschichtung an Glas adhären. Beide Zellen wurden allerdings in Mono- und in Kokultur grundsätzlich auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen kultiviert um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die Glasplättchen wurden in 1 N HCl und 80% Ethanol (beides für 1 Stunde, Schüttler; Abzug) entfettet und jeweils nach der HCl- und Ethanol-Prozedur für 1 Stunde unter leichtem Wasserfluss gewaschen. Die entfetteten und sterilisierten Glasplättchen (Autoklav, 120°C , 1 bar, 20 min) wurden unter sterilen Bedingungen abgeflammt, getrocknet und mit Poly-L-Lysin ($200 \text{ }\mu\text{g/ml}$) bei RT für 5 bis 24 Stunden beschichtet. Das überschüssige Poly-L-Lysin wurde durch 3-maliges Waschen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltiger Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (phosphat-buffered saline = PBS) entfernt.

2.2.1.2 Beschichtung und Vorbereitung von Pasteurpipetten für die Neuronen-Präparation

Die Pasteurpipetten wurden durch 4-faches Einsaugen von Sigmacote beschichtet (Abzug). Die Beschichtung verhindert, dass Ganglien an der Innen-Glaswandung haften bleiben. Die getrockneten und sterilisierten Pasteurpipetten wurden vor der Nutzung in der Sterilbank an der Spitze rundgeschmolzen um eine mechanische Schädigung der DRGs zu verhindern.

2.2.2 Präparation von DRG-Neuronen

Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden mit CO₂ getötet. Die Wirbelsäule wurde freigelegt, aus dem Tier getrennt und dorso-ventral in 2 Teile geschnitten. Nach Entfernung des Rückenmarks wurden die DRGs (ca. 40 Stück) von allen spinalen Segmenten mit Pinzette und Augenschere unter einem Stereomikroskop herauspräpariert, die Nervenfortsätze wurden entfernt, und die Ganglien wurden für 60 min bei 37°C in 125 U/ml Kollagenase Typ II angedaut. Kollagenase, gelöst in Ham's F12, diente dazu die Ganglien umgebende Bindegewebshülle aufzuschließen. Alle weiteren Schritte erfolgten in der Sterilbank. Nach 3-maligem Waschen mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS wurden die Ganglien in 10,000 U/ml Trypsin für 11 min bei 37°C inkubiert. Dieses war gelöst in Dulbecco'smodified Eagle's medium (DMEM). Für 3 weitere Waschschrte wurde Ham's F12 genutzt. Die mechanische Vereinzelung der Neurone geschah durch 10-faches Schütteln der DRGs und durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette. Die Einzelzellsuspension wurde bei 500 g (8 min) zentrifugiert, der Überstand mit Zelltrümmern verworfen und die Zellen wurden dann nochmals mit Ham's F12 gewaschen. Abschließend wurden die Neurone in Kokulturmedium (siehe Materialien zu 2.2) resuspendiert. Portionen von 50 µl wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Glas-Deckgläschen pipettiert und im Inkubator aufbewahrt (5% CO₂ und Luft, 37°C). Nachdem die Neurone über Nacht adhärerten, wurden sie täglich mit 1 ml Kokulturmedium gefüttert. Zur Bestimmung der Größenverteilung der Neurone in Kultur wurden die Zellen im Durchlichtmikroskop Axioplan visualisiert und mit Hilfe der Software Axiovision analysiert (100 Neurone pro Kultur).

2.2.3 Isolation von Knochenmarkzellen und deren Differenzierung zu Makrophagen

Adulte männliche Mäuse oder Ratten wurden getötet, die Hinterläufe vom Körper abgetrennt und dann von Haaren, Haut und Muskulatur befreit. Die freigelegten Tibiae und Femora wurden unter sterilen Bedingungen mehrfach mit 37°C warmen Ham's F12 mit Hilfe einer Spritze und Kanüle durchspült. Nachdem die ausgespülten Knochenmarkszellen bei 500 g in 8 min pelletierten, wurde das Pellet in Lysispuffer (siehe Materialien zu 2.2) resuspendiert und für 3 min inkubiert um die Erythrozyten zu zerstören. Die übrigen Knochenmarkszellen wurden nochmals zentrifugiert (500 g, 8 min), dann mit Ham's F12 gewaschen, erneut zentrifugiert und letztlich in Kokulturmedium aufgenommen (siehe Materialien zu 2.2). Die Knochenmarkszellen wurden zu je 1 ml in 12-well-Schalen auf Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen pipettiert und im Inkubator (5% CO₂, 37°C) aufbewahrt. Die spezifische Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen wurde durch Zugabe von 50 ng/ml Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF) induziert. Bone marrow-derived macrophages (BMDM) benötigen 7 Tage bis zur vollständigen Reifung. Kokulturmedium und M-CSF wurden alle 3 bis 4 Tage gewechselt. BMDM wurden zusätzlich über ihre Eigenschaft zur Adhärenz selektiert, da alle anderen nicht-adhärenen Knochenmarkszellen bei dem Mediumwechsel weggespült wurden. Die morphologischen Besonderheiten der undifferenzierten Knochenmarkszellen, der reifen Makrophagen und ihrer verschiedenen Aktivierungstypen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axio Observer.A1 untersucht.

2.2.4 Aktivierung von reifen BMDM

Unter M-CSF-Einfluss gereifte BMDM sind ruhende Makrophagen. Für die weiteren Experimente wurden BMDM in Mono- und in Kokultur entweder mit 1 µg/ml Lipopolysacchariden (LPS) und 10 nmol/l Interferon-γ (IFN-γ) oder 10 nmol/l Interleukin-4 (IL-4) oder 10 nmol/l Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) aktiviert. Je nachdem ob Langzeit- oder Kurzzeiteffekte untersucht werden sollten, dauerte die Aktivierungsdauer zwischen 5 min bis zu 48 Stunden.

2.2.5 Kokultivierung von DRG-Neuronen und BMDM

Es wurden 2 verschiedene Protokolle zur Kokultivierung von DRG-Neuronen (1,5 bis 2 Tage in Monokultur) und reifen (7 bis 8 Tage in Monokultur) BMDM etabliert. Bei dem Protokoll

für die indirekte Kokultur wurden BMDM und DRG-Neurone auf ihren 2 verschiedenen Glasplättchen belassen und mit einem Abstand von 3 mm in eine Petrischale positioniert. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht es, Zellkommunikation über Mediatoren zu untersuchen, die im Medium löslich sind und zudem gewisse Distanzen überwinden können. In dem Protokoll für die direkte Kokultur wurden BMDM auf DRG-Neurone gesät. BMDM wurden mit einem Zellschaber in 37°C warmen Kokulturmedium geerntet, die lebendigen Zellen mit Hilfe von Trypanblau identifiziert und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Dann wurden die BMDM in einer Dichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml auf die Glasplättchen der DRGs gesät. In dieser Versuchsanordnung kann die Kommunikation über direkte Zellkontakte oder über flüchtige Mediatoren untersucht werden. Die Kokulturen sind mindestens für eine Woche überlebensfähig, aber die meisten Versuche dauerten max. 48 Stunden.

Materialien zu 2.2

Kokultur-Medium: 2 mmol/l L-Glutamin (Sigma-Aldrich); 15% Pferdeserum (PAA; New Jersey; USA); 1% Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco); 10 ng/ml NGF (Enzo; Lörrach); 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Roth; Karlsruhe), ad. Ham's F12 (PAA)

Lysispuffer für Erythrozyten: 155 mmol/l NH₄Cl; 10 mmol/l KHCO₃; 0,13mmol/l EDTA

- Trypsin (Sigma-Aldrich, Saint Louis; USA)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza; Basel; Schweiz)
- Ham's F12 (PAA; Pasching; Österreich)
- M-CSF (Sigma-Aldrich)
- Ca²⁺/Mg²⁺-haltige/freie PBS (Gibco; Camarillo; USA)
- Zellschaber (Orange-Scientific; Braine-l'Alleud; Belgium)
- Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich)
- Sigmacote (Sigma-Aldrich)
- Kollagenase (Paesel und Lorei; Hanau; Deutschland)
- Neubauerzählkammer (Roth; Karlsruhe; Deutschland)
- Trypanblau (Sigma-Aldrich)
- TNF-α (Gibco)

- IL-4 (Sigma-Aldrich)
- LPS (Sigma-Aldrich)
- IFN- γ (R&D Systems; Minneapolis; USA)

2.3 Identifizierung der BMDM mittels Durchflusszytometer-Analyse

Reife ruhende und über 24 Stunden aktivierte BMDM (mit LPS/IFN- γ , IL-4, TNF- α) wurden vorsichtig mit einem Zellschaber in 37°C warmes Ham's F12 Medium geerntet. Die verschiedenen BMDM-Suspensionen hatten, mit 1×10^6 Zellen/ml je Ansatz, eine relativ hohe Konzentration, da bei jedem Waschschrift um die 10% der Zellen verloren gehen. Neben den 4 Suspensionen, die den verschiedenen Makrophagentypen entsprachen, gab es noch 2 Kontrollansätze. Eine Suspension ruhender BMDM ohne Antikörperzugabe (=ungefärbte Kontrolle) diente als Referenz für die Autofluoreszenz der Makrophagen. Die zweite Kontrolle, eine Lösung aus BD CompBeads, die anti-Ratten und anti-Hamster Antigenbindungsstellen auf der Oberfläche besaßen und mit APC/Cy7 und Pacific blue Fluoreszenzantikörpern inkubierten, (=Kompensationskontrolle), waren wichtig um die Fluoreszenzüberlappung zwischen den Fluorophoren abzuschätzen.

Alle 6 Proben wurden mit 4°C kaltem PBS (siehe 2.3.2) gewaschen und dann zentrifugiert (500 g, 6 min, 4°C). Alle Schritte der Antikörpermarkierung geschahen auf Eis. BMDM wurden mit den beiden polyklonalen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern anti-CD11b (APC/Cy7, Klon M1-70) und anti-F4/80 (Pacific blue, KlonCl:A3-1) für 20 min markiert. Die Zugabe von Aqua dye diente dem Ausschluss toter Zellen. Nach 2 Waschschriften mit PBA (siehe Materialien zu 2.3), die dazu dienten die überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen im BD LSRII Durchflusszytometer gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Flow Jo 8.1.1.

Materialien zu 2.3

PBS (10 x): 1,4 mol/l NaCl; 27 mmol/l KCl; 15 mmol/l KH₂PO₄; 81 mmol/l NaH₂PO₄;

pH 7,4; 10x PBS wurde vor Anwendung 10-fach verdünnt

PBA : PBS, 0.25% Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich); 0,02% NaN₃

- Aqua dye (Invitrogen; Carlsbad; CA; USA)
- BD CompBead; anti-Ratte/Hamster Ig (BD bioscience; San Jose, CA; USA)
- anti-F4/80, Pacific blue, KlonCI:A3-1 (BD bioscience)
- anti-CD11b, APC/Cy7, Klon M1-70 (Institut für Immunbiologie; Jena; Deutschland)

2.4 Calcium-Imaging in Mono- und Kokultur als Vitalitätstest

Monokulturen bzw. direkte Kokulturen (d 1 bis 3) wurden in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer (siehe 2.4.2) überführt und mit 5 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2 acetoxymethylester (Fura-2/AM) und 0,02% des Detergenzes Pluronic-127 beladen, beide gelöst in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO). Nach Ablauf der Inkubation (30 bis 60 min, 37°C) wurde ungebundenes Fura-2/AM mit 37°C warmen HEPES-Puffer (3 x 1 min) ausgewaschen. Die Farbstoff-beladenen Zellen wurden auf ihren Glasplättchen mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.A1 und 20er Objektiv (LD, Plan-Neofluar, 20x/0.4 corr.) visualisiert. In allen Experimenten waren die Zellen von ca. 37°C warmen HEPES-Puffer umgeben. Die Zellen wurden abwechselnd angeregt mit Licht von 340 nm (spezifisch für Fura-2/AM das Ca^{2+} gebunden hat) oder 380 nm (spezifisch für Ca^{2+} -freies Fura-2/AM). Emittiertes Licht von 510 nm wurde über eine gekühlte CCD-Kamera aufgenommen. Die Identifikation vitaler Neurone erfolgte mit Hilfe von KCl (50 mmol/l; in HEPES-Puffer). BMDM zeigen keinen Calcium-Influx nach Zugabe von 50 mmol/l KCl, aber reagieren auf 1 mmol/l ATP (Pelegri et al., 2009). Von den Zellen wurden alle 260 ms Fotos aufgenommen und diese Daten dann mit der Software von TILL Photonics analysiert. In allen Experimenten wurde erst das Hintergrundsignal abgezogen und dann die Verhältnisswerte von 340 nm zu 380 nm bestimmt, sodass die relative Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über die Zeit dargestellt werden konnte. Um die Calciumänderungen in bestimmten Zellen zu verfolgen, wurden Regions Of Interests (ROIs) festgelegt.

Protokoll: HEPES-Puffer wurde 20 s nach Beginn jedes Experimentes appliziert, um die mechanische Sensibilität der Zellen zu testen. Jedes Experiment dauerte 10 min und geschah ohne Durchstrom des Puffers. KCl wurde nach 8,20 min zugegeben, gefolgt von ATP (1 mmol/l) nach 9 min. Alle Zugaben wurden vorsichtig am Rand des HEPES-Puffer-gefüllten Bassins mit Zellen appliziert, nicht direkt auf die Zellen. Die erhaltenen Daten von TILL Photonics wurden im Excel ausgewertet.

Materialien zu 2.4

HEPES-Puffer: 150 mmol/l NaCl; 5 mmol/l KCl; 10 mmol/l Glukose; 10 mmol/l Hepes; 2 mmol/l CaCl₂; 2 mmol/l MgCl₂ (6 H₂O); pH 7,4

- Fura-2/AM (Invitrogen)
- Pluronic F-127 (Invitrogen)
- DMSO (Sigma-Aldrich)
- KCl (Roth)
- ATP (Sigma-Aldrich)

2.5 Vitalitätstest mit Trypanblau

Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in Zellen mit einer verletzten Zellmembran eindringen kann und somit tote Zellen im Durchlichtmikroskop blau erscheinen lässt. Der Farbstoff wurde Neuronen-Monokulturen (4 Tage in Kultur) und direkten sowie indirekten Kokulturen (2 Tage in Kokultur) zugefügt um die Mortalitätsrate abhängig von den Kultivierungsbedingungen zu bestimmen. Getestet wurde insbesondere der Einfluss der Stimulation der Makrophagen in Kokultur (2 Tage) mit LPS/IFN- γ , IL-4 oder TNF- α . Als Kontrolle wurden diese Stimulantien auch in Neuronen-Monokulturen getestet. Nach einer kurzen Inkubation (wenige min) der Kulturen mit Trypanblau (0,2% Endkonzentration), wurde der Anteil blauer zu nicht-blauer Zellen in 5 verschiedenen Regionen von jedem Glas-Deckgläschen mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Axiovert 40C) bestimmt. Pro Region wurden abhängig von der Dichte der Kulturen zwischen 100 bis 500 Zellen ausgezählt.

2.6 NO-Detektion mit Griess Reagenz**2.6.1 NO-Freisetzung der verschiedenen Makrophagentypen in Mono- und Kokultur**

Die Messung von flüchtigem NO in Kulturüberständen geschah indirekt über die Detektion von Nitrit. Dieses ist ein stabiles Oxidationsprodukt von NO in wässriger Lösung. Das Prinzip des Assays beruht auf der Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid (Komponente des Griess Reagenz) in saurer Lösung zu einem Diazoniumsalz. Dieses Salz wird dann an N-(1-

naphtyl)ethylenediamid (NED, weitere Komponente des Griess Reagenz) gekoppelt, sodass ein pinker Azofarbstoff entsteht, der photometrisch quantifiziert wird (siehe Abb. 5).

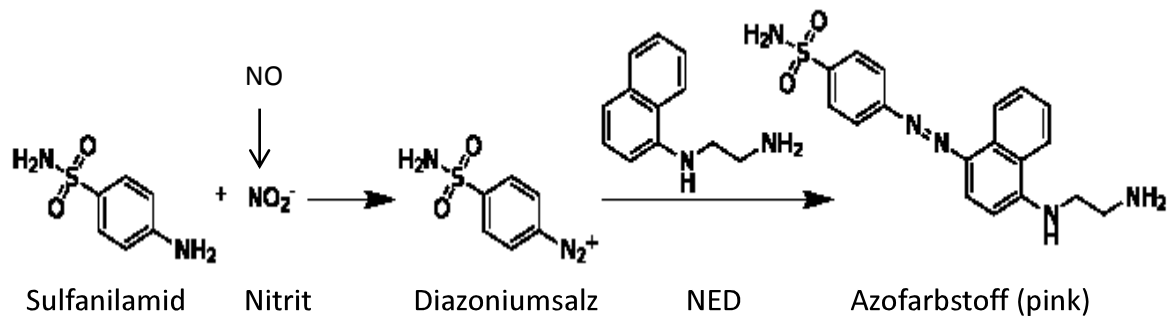


Abbildung 5 Griess Reaktion:

NO geht in wässriger Lösung zu Nitrit über, dass mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz reagiert, der dann durch Kopplung an NED zu einem Azofarbstoff konvertiert wird

Kulturüberstände von Makrophagen-Monokulturen und direkten sowie indirekten Kokulturen wurden ohne und nach 48-stündiger Stimulation (siehe 2.2.4) gesammelt und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. In einer Mikrotiterplatte (96 well) wurden 100 µl Kulturüberstand mit der gleichen Menge Griess Reagenz (siehe Materialien zu 2.6) gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Als Bezugspunkt für die Konzentrationsberechnung diente eine Standardkurve von Natriumnitrit (NaNO_2), welches stufenweise 1:2 verdünnt wurde, beginnend mit 100 µmol/l (dann 50 µmol/l, niedrigste Konzentration: 1,5 µmol/l). Die Absorption des Azofarbstoffes wurde bei 570 nm in einem Photometer bestimmt. Die Berechnung der Nitrit-Konzentration ausgehend von der Absorption des Azofarbstoffes und im Verhältnis zur NaNO_2 -Standardkurve erfolgte in Excel. Parallel zur NO-Konzentration wurde nach 48 Stunden die Todesrate in Neuronen-Monokultur und Kokultur mit Hilfe des Trypanblau Tests (siehe 2.5) bestimmt.

2.6.2 Test des iNOS-Inhibitors Aminoguanidin Hydrochlorid

Die NO-Produktion in direkter Kokultur wurde gezielt über LPS/IFN- γ induziert und durch simultane Zugabe von Aminoguanidin Hydrochlorid (0,1 oder 1 nmol/l) inhibiert. Die Wirkung des Inhibitors wurde mit dem Griess Test überprüft.

Materialien zu 2.6

Griess Reagenz: 2,5% H_3PO_4 ; 1% Sulfanilamid, 0,1% N-(1-Naphthyl)ethyldiamin-dihydrochlorid, ad. Aqua dest.

- Aminoguanidin Hydrochlorid (Tocris; Bristol; UK)

2.7 ELISA's von Kulturüberständen**2.7.1 Analyse von TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-10 in Makrophagen-Monokultur- und in Kokulturüberständen**

Zur Charakterisierung der BMDM-Aktivität im Zeitverlauf wurden reife BMDM für 60 min, 6 Stunden oder 24 Stunden mit LPS/IFN- γ , IL-4 oder TNF- α stimuliert, die Kulturüberstände wurden aliquotiert und bis zur Analyse in den ELISA's bei -20°C gelagert.

Zudem wurden Kulturüberstände von stimulierten (LPS/IFN- γ , IL-4 oder TNF- α) und unstimulierten Makrophagen-Monokulturen und Kokulturen nach 24 Stunden gesammelt, um die Zytokin-Produktion der BMDM abhängig von den Neuronen im ELISA zu untersuchen.

Alle ELISA-Sets waren spezifisch für Maus und wurden nach Angaben des Herstellers angewendet. Außer für den IL-6 ELISA (1:2; mit Ham's F12) kamen alle Überstände unverdünnt zum Einsatz. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Beschichtungs-Antikörper wurden Natriumcarbonat- (IL-1 β ; IL-6) bzw. Natriumphosphat-Puffer (IL-10; TNF- α) genutzt. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Form von TMB one-Lösung ausgewählt. Die Inkubation von TMB one wurde, sobald eine Blaufärbung zu erkennen war, mit 50 μl H_2SO_4 (2 N) abgestoppt. Durch die Ansäuerung konvertierte die Färbung dann zu gelb. Die Messung der Absorption erfolgte sofort bei 450 nm mit dem Photometer Tecan sunrise. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der Software Magellan3 und Excel durchgeführt.

2.7.2 Analyse der CGRP-Freisetzung in Neuronen-Monokultur und Kokultur

Um den Einfluss der BMDM auf die CGRP-Freisetzung und somit auf die Aktivität der DRG-Neurone zu untersuchen, wurden direkte Kokulturen für kurze Dauer (5, 20, 60 min) mit

LPS/IFN- γ stimuliert. Die Überstände wurden aliquotiert und mittels ELISA analysiert. Als Bezugswerte dienten Überstände unstimulierter direkter Kokulturen und als Kontrollen die Überstände LPS/IFN- γ -stimulierter Neuronen- und Makrophagen-Monokulturen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss von 45, 90 und 180 ng/ml IL-6 sowie dem löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) in Kombination mit 50 mmol/l KCl auf die CGRP-Freisetzung von Neuronen-Monokulturen untersucht. Die Kulturen wurden für 20 min nur mit KCl bzw. nur mit 180 ng/ml IL6/sIL-6R oder mit einer Kombination aus allen 3 Komponenten in einer Konzentrationsreihe inkubiert. Um zu prüfen, ob IL-6 und der sIL-6R auch getrennt wirken, wurden Neuronen-Monokulturen einzeln mit KCl/IL-6 bzw. KCl/sIL-6R behandelt.

Zur Stabilisierung von CGRP während der Lagerung bei -20°C wurde den Kulturüberständen EIA (Enzyme Immunoassay)-Puffer (siehe Materialien zu 2.7) zugefügt (20% Endkonzentration). Der Maus-spezifische CGRP-ELISA Kit wurde nach Angaben des Herstellers angewendet. Kokulturmedium und EIA-Puffer fungierten als Kontrolle für die Bindungsspezifität der Antikörper. Die Absorption wurde sofort bei 405 nm mit einem Photometer gemessen, und die Datenanalyse erfolgte in Magellan 3 und Excel.

Materialien zu 2.7

Waschpuffer (IL-6; IL-1 β ; TNF- α ; IL-10): PBS; 0,05% Tween-20; pH 7

Beschichtungspuffer (IL-6; IL-1 β): 0,1 mol/l Natriumcarbonat-Puffer; pH 9,5 0,713 g NaHCO₃; 0,15 g Na₂CO₃; ad. 100 ml Aqua dest.

Beschichtungspuffer (IL-10; TNF- α): 0,2 mol/l Natriumphosphatpuffer; pH 9,0 1,78 g NaH₂PO₄ (2x H₂O); ad 100 ml Aqua dest.

EIA-Puffer (CGRP): PBS; 10% FCS (Biowest)

- IL-6 (Gibco)
- sIL-6R (ProSpec; East Brunswick; NJ; USA)
- ELISA Sets für IL-6; IL-1 β ; IL-10 und TNF- α (BD bioscience; San Jose; CA; USA)
- TMB one (Promega; Madison; USA)

- CGRP ELISA Kit (SPI bio; Motigny le Bretonneux; Frankreich; Cusabio Biotech; Wuhan; China)

2.8 Antikörpermarkierung in Zellkultur, Milz- und DRG-Schnitten

2.8.1 Immunzytologie

Makrophagen wurden in Zellkultur mit dem Antikörper gegen CD68 identifiziert und über die Antikörper-Markierung von IL-6, iNOS, COX-2 und Arg1 charakterisiert. Zur Identifizierung von Neuronen wurde anti-Peripherin genutzt und die neuronale Regeneration in Zellkultur wurde über eine Markierung von ATF3 visualisiert (siehe Tabelle 1).

Um Zellkulturen mit Antikörpern markieren zu können, wurden sie bei RT für 30 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) im jeweiligen Stadium fixiert. Reste von PFA wurden mit PBS oder Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered Saline = TBS) in 3 Waschschritten á 5 bis 10 min ausgespült, abhängig davon welcher der beiden Puffer im Protokoll für die Antikörpermarkierung Anwendung fand. Bei der PFA-Fixierung werden Antigene von Zellen miteinander vernetzt. Um die Antigene wieder für den jeweiligen Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Zellen in 10 oder 100 mmol/l (abhängig vom Antikörper) Zitratpuffer (pH 6) für 15 min (120°C; 1 bar) autoklaviert. Nur für die Bindung des Antikörpers gegen BrdU war diese Prozedur nicht notwendig. Nachdem die Zellen langsam abgekühlt waren und der Zitratpuffer mit TBS oder PBS (3x 5 bis 10 min) ausgewaschen war, wurden die unspezifischen Antigen- Bindungsstellen in einer feuchten Kammer mit Serum (2 bis 10%; Superblock bei viel unspezifischer Hintergrundanfärbung: 30%-iges Serum), verdünnt in PBS oder TBS mit 1% TritonX-100 (TX-100), blockiert. Die Quelle des Serums war abhängig von dem Wirt, in dem der 2. Antikörper produziert wurde. Die primären und sekundären Antikörper wurden in der passenden Konzentration (siehe Tabelle 1 und 2) in Antikörpermedium (TBS oder PBS; 1% TX-100; 1% Fischgelantine) verdünnt. Die Inkubation des primären Antikörpers auf den Zellen erfolgte bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Nachdem ungebundene Anteile des primären Antikörpers in 3 Waschschritten entfernt wurden, inkubierte der sekundäre Antikörper für 2 Stunden bei RT in einer feuchten Kammer auf den Zellen.

2.8.1.1 Fluoreszenzmarkierungen

Bei Fluoreszenzmarkierungen wurde meist DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) der sekundären Antikörperlösung zugefügt, um Zellkerne zu markieren. Die sekundären Antikörper waren direkt mit einem Fluorophor gekoppelt, dessen Signal im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe eines geeigneten Filters sichtbar wurde (siehe Tabelle 2). Zuvor wurden sekundäre Antikörperreste durch 3 maliges Waschen mit PBS oder TBS ausgewaschen. Die markierten Zellen wurden in dem Fluoreszenz-stabilisierenden Medium Aqua Polymount eingebettet.

2.8.1.2 Peroxidasemarkierungen

Nach der Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 2), folgten 3 Waschschrte und danach die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC kit; Lösung A und B je 1:200 in Antikörpermedium) für 40 min bei RT (feuchte Kammer). Reste wurden in 3 Waschschrten entfernt, das Substrat der Peroxidase (JenchromTM px blue) wurde dazu gegeben und die Peroxidasereaktion durch Zugabe von 10 µl H₂O₂ (je 2 ml Substrat; 10%) auf den Zellen gestartet. Bei Erkennung eines dunkelblauen Niederschlags in den Zellen wurde die Reaktion durch Spülen mit Wasser gestoppt. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%; 70%; 96%; 2x 100%) dehydriert, anschließend für mehrere min in Xylol geschwenkt und dann in dem Kunstharz Entellan (gelöst in Xylol) eingebettet.

2.8.2 Immunhistologie

2.8.2.1 Induktion einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) bei Maus und Ratte

Am Tag 21 und 14 vor Auslösung einer AIA wurden 18 g/180 g schwere Mäuse/Ratten mit methylierten bovinen Serumalbumin (mBSA) immunisiert. Es wurde eine Emulsion aus 500/100 µg (Ratte/Maus) mBSA, gelöst in 500/50 µl (Ratte/Maus) physiologischer Kochsalzlösung, und 50 µl komplettem Freund'schem Adjuvans (complete Freund's adjuvant = CFA), supplementiert mit 2 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (H37RA), subkutan injiziert. Ausschließlich bei Mäusen erfolgte eine Verstärkung der Immunreaktion durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 5x 10⁸ hitzeinaktivierter Bordetella pertussis-Keime. Die Auslösung der monoartikulären AIA erfolgte durch Injektion von 500/100 µg (Ratte/Maus)

mBSA gelöst in 50/ 25 µl (Ratte/ Maus) Kochsalzlösung in den Gelenkspalt des rechten Kniegelenkes. Die AIA-erkrankten Tiere einer Versuchsgruppe wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (6 Stunden; 1 Tag; 3 Tage; 7 Tage nach Induktion der AIA) getötet um die verschiedenen Stadien der AIA-Pathogenese untersuchen zu können. Ratten wurden hierfür mit Natrium-Thiopental (Trapanal) durch i.p. Injektion narkotisiert. Mäuse hingegen wurden durch Isofluran mit einer Isofluranpumpe (mit N₂O und O₂; 1:2) betäubt. Das Herz der Versuchstiere wurde freigelegt, das Blut durch intrakardialen PBS*-Durchstrom entfernt um dann das Gewebe der Tiere über PFA (4%)-Durchstrom (Pumpengeschwindigkeit: 80 ml/h; 40 ml/h) fixieren zu können. Die perfusionsfixierten Wirbelsäulen wurden aus den Versuchstieren präpariert und in PFA (4%) bis zur Ganglien-Präparation nachfixiert.

2.8.2.2 Präparation von lumbalen und thorakalen DRGs

Die Wirbelsäule an AIA-erkrankter Tiere und gesunder Kontrolltiere wurde dorsal V-förmig eröffnet um die lumbalen und thorakalen DRGs besser nach Lage und Größe unterscheiden zu können. Die kaudal letzten sichtbaren DRGs sind die lumbalen (L1-L5), wobei L2 das größte DRG darstellt. Die Entnahme der DRGs erfolgte getrennt ipsilateral/lumbal, kontralateral/lumbal und thorakal (zur Kontrolle). Die Ganglien wurden zur weiteren Fixierung in 4% PFA gesammelt (4°C).

2.8.2.3 Einbettung der Ganglien in Paraffin und Anfertigung von Paraffinschnitten

Zusammengehörige Ganglien, transportiert in CellSafe Biopsiekapseln, wurden erst gewässert (3 Stunden oder über Nacht), dann in aufsteigender Alkoholreihe entwässert (30 min pro Konzentration) und über Nacht in 100% Methylbenzoat inkubiert. Die Lagerung der Ganglien für 1,5 Stunden in 60°C heißem, geschmolzenem Paraffin (Histotec) führt zu einer vollständigen Durchdringung. Nachdem die DRGs in Formen mit Paraffin aufgegossen wurden und über Nacht auskühlten (4°C), konnten von diesem Paraffinblöckchen mit Hilfe eines Mikrotoms 7 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt werden. Mehrere Schnitte (auf Wassertropfen) trockneten auf einer 37°C warmen Streckplatte auf Superfrost Plus-Objektträgern an.

2.8.2.4 Entparaffinierung und Antikörpermarkierung von DRG-Schnitten

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte für 2 x 10 min in Xylol gelagert. Dann wurden die DRGs zur Rehydrierung zuerst in 100% Ethanol (2 x 10 min) und in den weiteren Konzentrationen (je 1 min) der absteigenden Alkoholreihe (96%; 70%; 50%) inkubiert und abschließend in Wasser gewaschen.

Zur Identifizierung von Makrophagen in DRG-Schnitten von Ratten wurde der Antikörper ED1 genutzt. Die Charakterisierung der ED1-positiven Makrophagen wurden Doppelmarkierung mit IL-6 oder Arg1 oder iNOS oder COX-2 durchgeführt. Makrophagen in DRG-Schnitten von Mäusen sollten mit den Antikörpern gegen CD68, CD11b, CD11a und Iba1 markiert werden. Zur Identifizierung von T-Zellen wurden Markierungen mit anti-CD3; anti-TCR- α und anti-TCR- $\alpha\beta$ durchgeführt (siehe Tabelle 1 und 2). Die Durchführung der Antikörpermarkierungen erfolgte wie unter 2.8.1 für die Zellkultur (nach der PFA-Fixierung) beschrieben.

2.8.2.5 Abweichendes Vorgehen bei der Herstellung von Milzschnitten

Die Milz wurde von ventral an der linken Flanke von gesunden C57BL/6 Mäusen gewonnen. Die Schritte der Gewebefixierung mit PFA und der Paraffineinbettung der Milz verliefen ähnlich wie unter 2.8.2.3 für Ganglien beschrieben, aber aufgrund der Organgröße mit längeren Inkubationszeiten bei den Milzen. Sowohl die Anfertigung der Milzschnitte sowie das Entparaffinieren erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie für Ganglienschnitte (2.8.2.3/4) angegeben und die Markierung mit Antikörpern verlief wie unter 2.8.1 für Zellkulturen angegeben. Die fertigen Milzschnitte dienten dem Test und der Konzentrationsbestimmung von Immunmarkern (CD3, CD68), die danach zur Analyse von DRG-Schnitten genutzt wurden.

2.8.2.6 Herstellung von DRG- und Milz- Kryoschnitten

Gleich nach der Organentnahme wurden DRGs und Milz für 24 Stunden in PFA fixiert, dann in Methylbutan getränkt und auf Trockeneis eingefroren. Bis zum Anfertigen von Gewebeschnitten lagerten Milz und DRGs bei -80°C. Die Einbettung der Organe erfolgte in Tissue Freezing Medium auf Eis. Sobald das Einbettmedium fest wurde, konnten die Gewebe im Kryostat Leica CM30505 auf 10 μ m geschnitten werden und auf Objektträgern bei 37°C

auf der Streckplatte trocknen. Bis zur Antikörpermarkierung lagerten die Schnitte bei -20°C (Protokoll 2.8.1).

2.8.2.7 Mikroskopie

Die durchgeführten Antikörpermarkierungen wie die Peripherin-Anfärbung der Neurone in Mono- und Kokultur, die ATF3-Anfärbung der Neurone in Monokultur, die CD68, IL-6-, COX-2-, iNOS- und Arg1-Markierungen von BMDM-Monokulturen und die Anfärbungen von CD3, TCR- α , CD11b, CD68 und Iba1 an DRG-Schnitten wurden über das Durchlicht- und Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan 2 visualisiert. Zur besseren Erkennung von einzelnen Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI markiert. Eine Übersicht der genutzten Fluoreszenzfilter zu den jeweiligen Fluorophoren ist in Tabelle 2 zu finden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Bildanalyse-Systems AxioVision. Der Anteil ATF3-positiver Neurone wurde über die Zählung der markierten Zellkerne quantifiziert. Der Anteil CD68-positiver BMDM wurde über die Analyse des Grauwertes der einzelnen Zellen bestimmt. Die Doppelmarkierungen von Makrophagen in DRG-Schnitten mit ED1 und IL-6 oder COX-2 oder iNOS oder Arg1 wurden zur detaillierteren Darstellung im konfokalen Laser Scanning Mikroskop TCS SP5 analysiert. Zellkerne wurden mit Hoechst 34580 markiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit einem Argon-Laser (488 nm), einem diodengepumpten Festkörperlaser (561 nm) oder einem Diodenlaser (405 nm) angeregt. Die grünen Fluoreszenzsignale wurden zwischen 500 nm und 555 nm, die roten Fluoreszenzsignale wurden zwischen 570 nm und 700 nm und die blauen Fluoreszenzsignale wurden zwischen 410 nm und 475 nm detektiert. Dazu wurde ein 20 x 0,7 Trockenobjektiv oder ein 63 x 1,40 Öl-Objektiv genutzt.

Materialien zu 2.8

TBS: 20 mmol/l Tris; 1,37 mmol/l NaCl; ad. Wasser; pH 7,6

PBS*: mit 0,1% Natriumnitrit; 10000 U/l Heparin-Natrium 25000 (Ratiopharm; Ulm; Deutschland)

PFA: 4% in 0,1 mol/l Phosphatpuffer; 20 mmol/l NaH_2PO_4 ; 80 mmol/l Na_2HPO_4 ; pH 7,4

PBS (siehe Materialien zu 2.3)

Zitratpuffer: 0,1 mol/l Zitronensäure in Aqua dest.; pH 6

- Zitronensäure (Sigma-Aldrich)
- TX-100 (Sigma-Aldrich)
- Ziegenserum (Aurion; Wageningen; Niederlande)
- Fischgelantine (Sigma-Aldrich)
- DAPI (Sigma-Aldrich)
- Hoechst 34580 (Invitrogen)
- Aqua Polymount (Polyscience Inc; Warrington; USA)
- Vectastain ABC kit (Vector Laboratories; Burlingame; USA)
- Jenchrome™ px blue Detectionssystem (JenLab GmbH; Jena; Deutschland)
- H₂O₂ (Sigma-Aldrich)
- Entellan (Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland)
- Paraffin (Histotec; Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland)'
- Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems Nussloch GmbH; Nussloch; Deutschland)
- CFA (Complete Freund's Adjuvant) (Sigma-Aldrich)
- Mycobacterium tuberculosis (Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg; Deutschland)
- Bordetella pertussis-Keime (Chiron-Behring, Marburg; Deutschland)
- methyliertes bovines Serumalbumin (mBSA) (Sigma-Aldrich)
- Trapanal (Incesa; Freiburg; Deutschland)
- Isofluran (Actavis; Langenfeld; Deutschland)
- CellSafe Biopsiekapseln (Leica; Wetzlar; Deutschland)

Tabelle 1: Liste primärer Antikörper

Teil 1: Immunzellmarker (M. = Makrophagen; P = Paraffin; Kryo = Kryoschnitte); Klonalität: p = polyklonal
oder m = monoklonal

Antigen Firma	Anwendungs- zweck	Wirt Klonali- tät	Reaktivität	Applikation	2. Anti- körper (siehe Tabelle 2)	Ver- dün- nung	Puf- fer
Arg1; BD Bioscience	M.-charakter- isierung	Kanin- chen (m)	Maus, Ratte	Zellkultur DRG- Schnitte (P)	6.	1:100	TBS
BrdU Cedarlane	Proliferations- Marker	Ratte (m)	künstl. appliziertes BrdU	Zellkultur	3.	1:500	TBS
CD3 Abcam	T-Zell-Marker	Kanin- chen (p)	Maus, Ratte	DRG-Schnitte (P)	2.; 5.	1:100	TBS/ PBS
CD3- ζ Santa Cruz	T-Zell-Marker	Maus (m)	Maus, Ratte	Western Blot	7.	1:200	TBS- Tween
CD11a Antikörper- online	Leukozyten- Marker	Kanin- chen (p)	Ratte	DRG-Schnitte (P)	2.; 5.	1:100	PBS
CD11b Abcam	Leukozyten- Marker	Maus (m)	Ratte	DRG-Schnitte (P)	1.	1:100	PBS
CD11b Immuno- logie Jena	Leukozyten- Marker	Zell- kultur (m)	Maus	Durchfluss- zytometrie	-	1:100	PBA
CD68 Serotec	M.-marker	Maus (m)	Ratte	DRG-Schnitte (P)	1.	1:50 1:100	TBS
CD68 Serotec	M.-marker	Ratte (m)	Maus	Zellkultur, DRG- Schnitte & Rückenmark (P)	3.; 6.	1:50	PBS
CD68 Abcam	M.-Marker	Kanin- chen (p)	Maus	DRG-Schnitte & Milz (P) (Kryo)	1.	1:50	PBS
CD68 Abcam	M.-Marker	Ratte (m)	Maus	DRG-Schnitte & Milz (P) (Kryo)	6.	1:50	PBS
COX-2 DBS	M.-Charakter- isierung	Kanin- chen	Maus, Ratte	DRG-Schnitte (P); Zellkultur	4., 5.	1:100	PBS/ TBS
F4/80 Serotec	M.-Marker	Ratte (m)	Maus	Zellkultur DRG-Schnitte (P)	3.; 6.	1:100	PBS
F4/80 Biolegend	M.-Marker	Ratte (m)	Maus	Durchfluss- zytometrie	-	1:100	PBA
Iba1 Wako	M.-Marker	Kanin- chen (p)	Maus	DRG-Schnitte (P) (Kryo)	2.	1:250	TBS/ PBS

IL-6 Abcam	M.-Charakterisierung	Kaninchen (p)	Maus, Ratte	Zellkultur, DRG-Schnitte (P)	5.	1:100	TBS
iNOS Abcam	M.-Charakterisierung	Kaninchen (p)	Maus, Ratte	Zellkultur, DRG-Schnitte (P)	5.	1:100	TBS
TCR α Abcam	T-Zell-Marker	Kaninchen (p)	Maus Ratte	DRG-Schnitte (P)	5.	1:100	PBS
TCR $\alpha\beta$;BD bioscience	T-Zell-Marker	Maus (m)	Ratte	DRG-Schnitte (P)	1.	1:100	PBS

Teil 2: Neuronale Marker

Antigen Firma	Anwendungszweck	Wirt Klonalität	Reaktivität	Applikation	2. Antikörper	Verdünnung	Puffer
ATF3 Santa Cruz	Marker für Zellregeneration	Kaninchen (p)	Maus	Zellkultur	4.	1:100	PBS
Peripherin Millipore	Neuronen-Marker	Kaninchen (p)	Maus	Zellkultur	5.	1:200	PBS

Tabelle 2 Liste sekundärer Antikörper

Konjugation	Wirt	Reaktivität	Extinktion/Emmission [nm]	Firma	Verdünnung
1. Alexa Fluor 488 IgG (H+L)	Ziege	Maus	488/ 519 (Filter 9) grüne Fluoreszenz	Invitrogen	1:200
2. Alexa Fluor 568 IgG (H+L)	Ziege	Ratte	546/ 590 (Filter 15) rote Fluoreszenz	Invitrogen	1:100
3. Biotin (Peroxidase- reaktion mit Substrat JenchromTM px blue)	Esel	Ratte	Durchlicht schwarzer Niederschlag	Jackson Immuno Research	1:500
4. Biotin (Peroxidase- reaktion mit Substrat JenchromTM px blue)	Ziege	Kaninchen	Durchlicht schwarzer Niederschlag	Dako	1:100
5. Cy 3 IgG (H+L)	Ziege	Kaninchen	550/570 (Filter 15) rote Fluoreszenz	Jackson Immuno Research	1:200
6. Biotin (Peroxidase- reaktion mit Substrat JenchromTM px blue)	Ziege	Ratte	Durchlicht schwarzer Niederschlag	Invitrogen	1:200
7. Peroxidase (Substrat: Luminol)	Ziege	Maus	Chemolumineszenz	KPL (Gaithers- burg; MD; USA)	1:10000

2.9 Proliferationsassay mit Bromodesoxyuridin (BrdU)

BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleotids Thymidin. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass BrdU anstatt Thymidin in die DNS bei der Zellteilung eingebaut wird. Mittels immunozytochemischer Markierung der Zellen mit einem Antikörper gegen BrdU kann die erfolgte DNS-Synthese sichtbar gemacht werden.

Um die Proliferationsrate reifer BMDM in Zellkultur abhängig von der Anwesenheit von Neuronen zu untersuchen, wurden 10 $\mu\text{mol/l}$ BrdU zu direkten und indirekten Kokulturen, sowie zu Makrophagen-Monokulturen (Kontrolle) appliziert. In einem Vortest wurde mittels Zeitreihe (1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden) eine günstige Proliferationsdauer bestimmt. In allen weiteren Versuchen wurden die Zellen über 24 Stunden mit BrdU inkubiert. Als Positivkontrolle für den Proliferationsassay diente die Zugabe von M-CSF (25 $\mu\text{l/ml}$) zusammen mit BrdU zu Makrophagenmonokulturen, da dieses ein bekannter Induktor der Makrophagen-Zellteilung ist. DRG-Neurone wurden in Kokultur mit Capsaicin und (50 mmol/l) KCl stimuliert um zu untersuchen, ob eine neuronale Aktivierung die Proliferation der BMDM modulieren kann.

Nach 24-stündiger Inkubation der verschiedenen Zellkulturansätze mit BrdU, erfolgte die Fixierung der Zellen für 30 min (RT) in 4% PFA. Das Fixanz wurde durch 3-maliges Waschen mit TBS (je 5 min) entfernt. Eine Inkubation der fixierten Zellen mit 0,6% H_2O_2 (in TBS) diente dazu die endogene Peroxidase zu aktivieren, dadurch restliches ATP zu verbrauchen (30 min) und somit die endogene Peroxidaseaktivität zu unterbinden. Nach 2 weiteren Waschschritten mit TBS (je 5 min) wurde 2 N HCl (37°C; 30 min) hinzugefügt, das die Struktur der DNS aufbricht und dadurch das gebundene BrdU für den Antikörper zugänglich macht. Es folgte eine Inkubation in 0,1 mol/l H_3BO_3 (in Aqua dest.; 20 min; RT), das mit TBS (2x 5 min) ausgewaschen wurde. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Protokoll zur Antikörpermarkierung (siehe 2.8). Als Serum zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen diente 2% Eselserum in TBS mit 0,1% TX-100. Der primäre Antikörper anti-BrdU (1:500) wurde in TBS mit 0,1% TX-100 verdünnt. Der sekundäre Antikörper war biotinyliert, sodass BrdU über die Peroxidasereaktion (siehe 2.8.1.2) sichtbar gemacht wurde.

Zur Auswertung der Proliferationsrate wurden in 20 Bildausschnitten im Lichtmikroskop Axioplan 2 der Anteil proliferierter (dunkel markiert) Zellen ausgezählt (ca. 400 bis 500).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob $\text{TNF-}\alpha$ einen Einfluss auf die Proliferationsrate in Makrophagen-Monokulturen ausübt. Dafür erfolgte eine Inkubation von

10 nmol/l TNF- α in Zellkultur (24 Stunden). Der Effekt von TNF- α wurde zudem in direkter Kokultur getestet, indem Etanercept (1 mg/ml) bzw. die Rezeptorantagonisten TNFR1 (10 μ g/ml) oder TNFR2 (5 μ g/ml) appliziert wurden. Im Unterschied zu den Antikörpern gegen die beiden TNF-Rezeptoren, bindet Etanercept direkt TNF- α und verhindert somit dessen Bindung an seine Rezeptoren. Etanercept ist ein dimeres Fusionsprotein, bestehend aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des TNF-Rezeptors 2 verbunden mit dem Fc-Teil des IgG1-Antikörpers. Des Weiteren wurde der Einfluss von neuronalem NO auf die Makrophagenproliferation untersucht indem der iNOS-Inhibitor Aminoguanidin Hydrochlorid zu direkten Kokulturen gegeben wurde. Die Inhibitoren wurden parallel zu BrdU appliziert und alle anderen Schritte des Proliferationsassays verliefen wie oben unter 2.9 beschrieben. Der Einfluss aller Inhibitoren wurde zur Kontrolle auch in Makrophagen-Monokulturen getestet, um sicherzustellen, dass der Effekt über die DRG-Neurone erfolgt.

Materialien zu 2.9

- TBS (Tris Buffered Saline; Tris-gepufferte Salzlösung) (siehe Rezept 2.8.3)
- Bromodesoxyuridin (BrdU) (Sigma-Aldrich)
- Capsaicin (Sigma-Aldrich)
- TNFR1 Antikörper (R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt; Deutschland)
- TNFR2 Antikörper (R&D Systems)
- Etanercept (Enbrel; Pfizer Limited; Sandwich; UK)
- Aminoguanidin Hydrochlorid (Tocris)
- Eselserum (Dianova; Hamburg; Deutschland)

2.10 Western Blot

Im Western Blot wurde die Expression von CD3 in DRG-Proben und Neuronen-Monokulturlysaten untersucht. Als Positivkontrolle diente eine Probe der Milz und als Negativkontrolle eine Probe von Makrophagen-Monokulturen.

2.10.1 Probenaufarbeitung: Zellyse und Proteinextraktion

Neuronen-Kulturen (1 Tag) und BMDM-Kulturen (8 Tage) wurden mit einem Zellschaber auf Eis in kaltem PBS geerntet (6 Kulturen; $1 - 5 \times 10^5$ Zellen/ml) und dann bei 4°C 5 min zentrifugiert (125 g). Im Falle einer späterer Nutzung kann das Pellet nun bei -20°C eingefroren werden. Zum Aufschluss der Zellen wurde 100 µl Zell-Lysispuffer zugesetzt, die Zellsuspension mit dem Vortexer gemixt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (4°C; 20 min; 16000 g). Der Überstand aus extrahierten Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet wurde verworfen.

DRG-Gewebeproben wurden hingegen mit Ultraschall bei höchster Intensität aufgeschlossen (4 min; auf Eis; in 100 µl Zell-Lysispuffer).

Zur Aufbereitung der Milzproben wurde die Milz einer gesunden C57BL/6-Maus zerkleinert, durch ein Zellsieb gedrückt und in Ham's F12 Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (6 min; 400 g), das Pellet wurde in Erythrozyten-Lysispuffer (siehe Materialien zu 2.2) aufgenommen und für 1 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Erythrozyten-Lysispuffer ausgewaschen und durch Zell-Lysispuffer ersetzt.

Zu den jeweiligen aufgearbeiteten Proben wurde der Lämmli-Ladepuffer (1:5; siehe Materialien zu 2.10) zugegeben und die Proben wurden für 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert.

2.10.2 Gel-Elektrophorese

Trenngel	30% Polyacrylamid	Trenngelpuffer	20 % SDS	Wasser	20 % APS	TEMED
12,5 % (2 kleine Gele)	6,3 ml	2,85 ml	75 µl	5,85 ml	60 µl	10 µl
Sammelgel	30 % Polyacrylamid	Sammelgelpuffer	20 % SDS	Wasser	20 % APS	TEMED
4 % (2 kleine Gele)	0,66 ml	1,25 ml	25 µl	3,1 ml	30 µl	4 µl

Zur Abdichtung der Gelapparatur wurden 1 ml vom Trenngel-Ansatz mit 1,5 µl TEMED vermischt (reicht für 2 Gele). Zur Beladung der fertigen Gele wurden maximal 40 µl Probe pro Tasche und 6 µl des Größenmarkers ColorPlus prestained marker eingesetzt. Nach der Beladung der Gele mit Proteinproben wurde die Apparatur mit Elektrophoresepuffer (siehe Materialien zu 2.10) aufgefüllt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei 120 V in ca. 2 Stunden.

2.10.3 Western Blot und CD3-Antikörpermarkierung

In Vorbereitung für den Western Blot equilibrierten das Whatmanpapier und das Gel für 15 min in Transferpuffer und die PVDF-Membran wurde in 100% Methanol (1 min) aktiviert. Das Prinzip des Western Blot besteht darin, dass die durch SDS-Bindung negativ-geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Pluspol in die PVDF-Membran wandern. Nach diesem Prinzip wurde der Western Blot geschichtet, sodass außen jeweils 3 Lagen Whatmanpapier lagen, am Minuspol das Gel und am Pluspol die PVDF-Membran. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 1-2 mA/cm² in 1 Stunde.

Zur Markierung der Proteine auf der Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen CD3, wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen mit 3% BSA in TBS-Tween (0,05% Tween) geblockt (1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C). Der Antikörper gegen CD3 (siehe Tabelle 1) wurde auch in der gleichen BSA-TBS-Tween-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem der CD3-Antikörper in 3 Waschschritten á 15 min entfernt wurde, folgte eine Inkubation des sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gelöst in TBS-Tween (0,05%) und 5% Magermilchpulver für 45 min bei RT. Der sekundäre Antikörper wurde in 3 Waschschritten mit TBS-Tween entfernt (letzter Waschschriff nur mit TBS). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung der verschiedenen Taschen wurde das konstitutiv exprimierte β -Aktin markiert. Die Antikörpermarkierung wurde durch die Peroxidase-katalysierte Umsetzung von Luminol in Form von Chemolumineszenz sichtbar. Luminol (Super Signal West Dura extended duration substrate) wurde für 1 min auf der Membran inkubiert und die entstehende Chemolumineszenz wurde über das Gerät namens G-Box (Software Gene Snap) detektiert.

Materialien zu 2.10

Zell-Lysispuffer (RIPA): 20 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5); 150 mmol/l NaCl; 1 mmol/l Na₂EDTA; 1 mmol/l EGTA; 1% NP-40; 1% Natrium Deoxycholat; 2,5 mmol/l Natrium Pyrophosphat; 1 mmol/l β -Glycerophosphat; 1 Tablette Protease-Inhibitor auf 10 ml (Roche; Basel; Deutschland)

Trenngelpuffer: 2 mol/l Tris (Sigma-Aldrich); pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 mol/l Tris; pH 6,8

Transferpuffer: 48 mmol/l Tris; 39 mmol/l Glycin; 15% Methanol; 0,037% SDS

TBS-Tween (Tris buffered saline; Tris-gepufferte Salzlösung) (siehe Rezept 2.8.3); 0,05% Tween

Lämmli-Ladepuffer (6x): 6% SDS; 40% Glycerol; 30% β -Mercaptoethanol; 100 mmol/l Tris (pH 7,5); 1 Spatelspitze Bromphenolblau)

- Polyacrylamid (Roth)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- APS (Roth)
- TEMED (Roth)
- Whatman-Papier (VWR; Darmstadt; Deutschland)
- PVDF-Membran (Millipore; Darmstadt; Deutschland)
- Magermilchpulver (AppliChem; Darmstadt; Deutschland)
- Super Signal West Dura extended duration substrate (Thermo Scientific; Waltham; MA; USA)
- Größenmarker ColorPlus prestained protein ladder (New England Biolabs; Frankfurt am Main; Deutschland)

2.11 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde IBM SPSS 21 genutzt. Weil die Anzahl der Versuchswiederholungen hauptsächlich unter 10 lagen und somit ein Test auf Normalverteilung nicht aussagekräftig wäre, wurden nicht-parametrische Tests genutzt. Der Kruskal Wallis Test diente der Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen mehreren

Versuchsgruppen und der Mann-Whitney U-Test wurde angewendet um 2 unabhängige Versuchsgruppen zu vergleichen. Signifikante Unterschiede wurden anerkannt, wenn $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

2.12 Geräte und Programme

- BD LSRII Durchflusszytometer (Becton Dickinson Bioscience) mit Verarbeitungssoftware Flow Jo 8.1.1 (Treestar; Ashland; Oregon)
- Mikroskop Axio Observer.A1 (Zeiss; Jena; Deutschland)
- Mikroskop Axiovert 40C (Zeiss)
- Axioplan 2 (Zeiss) mit Verarbeitungssoftware AxioVision (Zeiss)
- Stereomikroskop Stemi 2000 (Zeiss)
- Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments; Hanau; Deutschland)
- Wellwash 4 MK2 (Thermo Scientific; Waltham; MA; USA)
- konfokales Laser Scanning Mikroskop Leica TCS SP5 (Leica; Wetzlar; Deutschland)
- Photometer Spectramax M2 (Molecular Devices; Biberach an der Riss)
- Photometer Tecan sunrise (Tecan; Männedorf; Schweiz) mit Software Magellan 3 (Tecan)
- Mikrotom (Jung; Heidelberg; Deutschland)
- Kryostat Leica CM30505 (Leica)
- Gel-Apparatur (Biometra; Göttingen; Deutschland)
- Transfer-Apparatur: TE 77; ECL Semi Dry Transfer Unit (VWR)
- G-box (Synvolux; Groningen; Niederlande) mit Verarbeitungssoftware Gene Snap

3. Ergebnisse

3.1 BMDM in Monokultur

3.1.1 Morphologie der Differenzierungsstadien

Der erste Schritt zur Etablierung einer Kokultur bestand in der Generierung und Analyse von Makrophagen-Monokulturen. In Abb. 6A sind undifferenzierte Knochenmarkszellen 2 Tage nach der Isolation abgebildet. Die Selektion von adhärenenten Zellen und die Behandlung der Zellen mit M-CSF für 7 Tage führten zur Differenzierung ruhender Makrophagen (Abb. 6B). Durch *in vitro* Stimulation der reifen BMDM mit IL-4 (Abb. 6C) zu M2-Makrophagen (24 Stunden) ergab sich morphologisch ein ähnliches Bild wie in ruhenden BMDM-Kulturen. Nach Stimulation der BMDM mit TNF- α (Abb. 6D) oder LPS/IFN- γ (Abb. 6E) zu M1-Makrophagen erschienen sie weniger rund und entwickelten mehr Pseudopodien als un- oder IL-4 stimulierte BMDM.

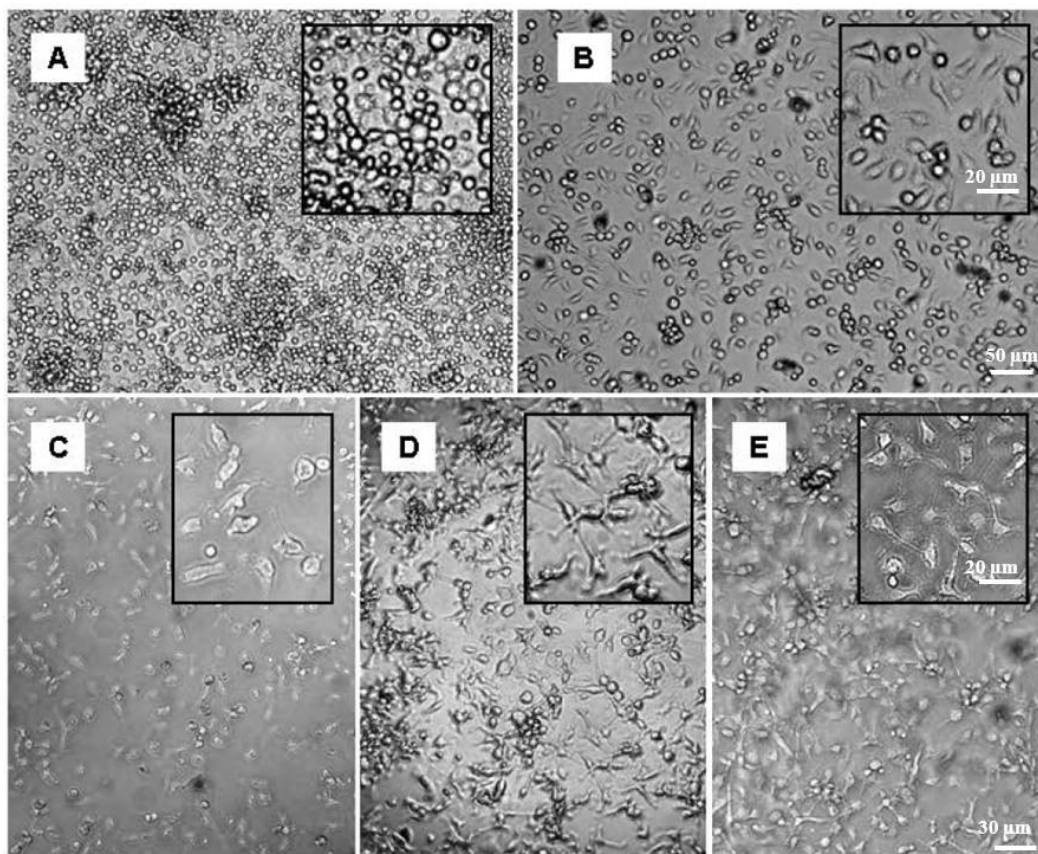


Abbildung 6 BMDM in Monokultur

6A Undifferenzierte Knochenmarkszellen 2 Tage nach der Isolation eingesät in hoher Dichte; viele nicht adhärenente Zellen **6B** Adhärenente und differenzierte BMDM 5 Tage später, frei schwebende Zellen wurden mit dem Mediumwechsel entfernt **6C** IL-4 stimulierte Makrophagen sind morphologisch ruhenden Makrophagen ähnlich **6D/6E** TNF- α - und LPS/IFN- γ -stimulierte Makrophagen sind ausgereckter. (Die Maßstabsbalken in Abb. 6B und 6E gelten für die gesamte jeweilige Zeile.)

3.1.2 Charakterisierung der BMDM mit typischen Makrophagenmarkern

Durchflusszytometrische- und immunzytochemische Analysen zeigten, dass es sich bei dem größten Teil der *in vitro* differenzierten Knochenmarkzellen um Makrophagen handelte. Bei der Durchflusszytometrie-Untersuchung wurden die Marker F4/80 gekoppelt mit Pacific blue und CD11b markiert mit APC/Cy7 genutzt (Abb. 7). Abb. 7A stellt exemplarisch die Autofluoreszenz der Zellen (ohne Antikörper-Behandlung) in den Bereichen für APC/Cy7 und Pacific blue dar. Abb. 7B zeigt trotz hoher Autofluoreszenz der Zellen eine eindeutige Markierung ruhender BMDM (7 Tage in Kultur) mit CD11b und F4/80. Das Beispiel illustriert, dass die Stimulation der Zellen mit TNF- α (Abb. 7C) oder LPS/IFN- γ (Abb. 7D) eine anfänglich F4/80-negative Punktwolke im Histogramm in den positiven Bereich verschiebt. Die Auswertung von 5 unabhängigen Experimenten ist in Abb. 7E dargestellt. F4/80 wurde hochreguliert von $48,8 \pm 9,6\%$ bei ruhenden BMDM auf $67,7 \pm 7,8\%$ durch IL-4 Stimulation, auf $71 \pm 6,1\%$ durch TNF- α -Zugabe und auf $75,4 \pm 4,7\%$ über LPS/IFN- γ -Aktivierung. Die Regulation der F4/80-Expression durch Stimulation der Makrophagen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Vereyken et al., 2011). Im Unterschied dazu wurde die Expression von CD11b in mehr als 80% (zwischen 82 - 87%) der BMDM ermittelt unabhängig von der Stimulation der Zellen.

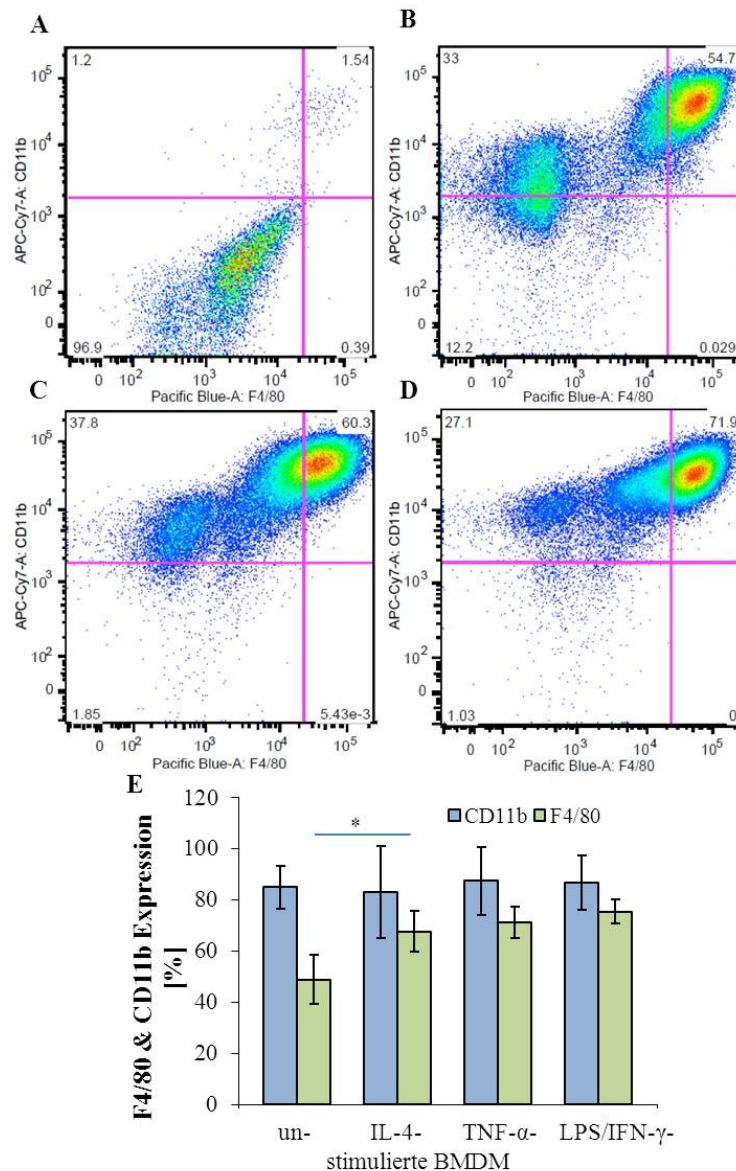


Abbildung 7 Durchflusszytometer-Analyse von BMDM mit den Markern F4/80 und CD11b

7A Gating der ungefärbten BMDM zur Bestimmung der Autofluoreszenz in den Bereichen APC/Cy7 und Pacific blue **7B** Anfärbung ruhender, **7C** TNF- α stimulierter und **7D** LPS/IFN- γ stimulierter BMDM. Jedes dieser Histogramme illustriert ein repräsentatives Ergebnis **7E** Quantitative Analyse der CD11b- und F4/80-Expression von ruhenden-, IL-4-, TNF- α -, LPS/IFN- γ stimulierten BMDM (n = 5) (%-ualler MW \pm SD). Über 80% der in vitro generierten Zellen exprimieren CD11b. F4/80 wurde signifikant nach IL-4-, TNF- α - und LPS/IFN- γ -Stimulation hochreguliert (*p < 0,05; Mann-Whitney-U-Test).

Das lysosomale Protein CD68 diente zusätzlich als Makrophagenmarker und wurde mittels Immunzytochemie detektiert (Abb. 8). Die Grauwertanalyse der CD68-Expression (Abb. 8B) zeigte, dass 92% der reifen BMDM (7 Tage) einen Grauwert über dem der Kontrollanfärbung ohne 1. Antikörper (Abb. 8C) besitzen. Die Durchflusszytometrie und Immunzytochemie Analysen zeigten somit, dass mindestens 80% der Knochenmarkszellen zu Makrophagen differenziert waren.

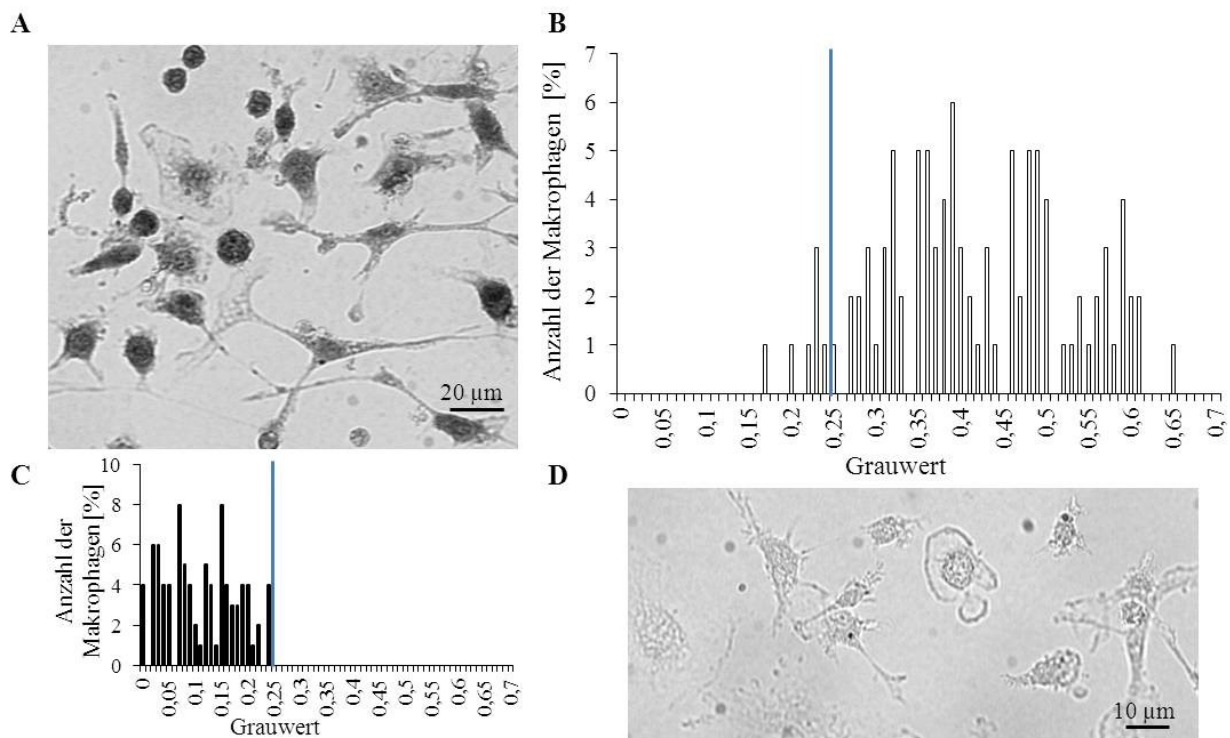


Abbildung 8 Immunzytochemische Analyse ruhender BMDM (7 Tage) mit CD68

8A In BMDM-Kulturen erkennt man hauptsächlich CD68-positive Zellen **8B** Die Grauwertanalyse zeigt, dass 92% (n = 5 Kulturen) der Zellen einen Grauwert über dem Wert der Kontrolle haben **8C** In Kontroll-Anfärbungen ohne 1. Antikörper liegt der Grauwert bei 0,25 **8D** auch optisch erkennt man keine unspezifische Markierung des 2. Antikörpers.

3.1.3 Zytokinsekretion in BMDM-Monokultur

Zur weiteren Charakterisierung wurde, wie in Tabelle 3 dargestellt, die NO- und Zytokinfreisetzung von BMDM in Abhängigkeit des jeweiligen Aktivitätszustandes der Makrophagen nach 24 Stunden Stimulation gemessen. Im Unterschied zu ruhenden BMDM sezernierten LPS/IFN- γ -stimulierte BMDM proinflammatorische Zytokine wie IL-6 (1941 ± 437 pg/ml), TNF- α (1121 ± 190 pg/ml) und IL-1 β ($59 \pm 31,7$ pg/ml), aber auch NO ($25,63 \pm 3,3$) und IL-10 ($161,8 \pm 77,2$ pg/ml). Dieses Sekretionsmuster ist charakteristisch für klassisch aktivierte M1-Makrophagen (Ma et al., 2003). TNF- α -Stimulation von BMDM bewirkte eine moderate Freisetzung von IL-6 ($119 \pm 62,3$ pg/ml), aber keine NO-Sekretion (Subtyp von M1-Makrophagen). Im Kontrast, alternative Aktivierung durch IL-4 induziert weder eine Freisetzung von IL-6 oder TNF- α , noch von NO. Dies ist charakteristisch für M2-Makrophagen (Verreck et al., 2004).

Tabelle 3 Profil der Zytokinsekretion von BMDM abhängig von ihrem Aktivierungsstatus (24 Stunden)

In ruhenden BMDM-Kulturen wurden nahezu keine freigesetzten Zytokine und NO detektiert. Die Stimulation mit LPS/IFN- γ hingegen führte zur Sekretion von IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 und auch hohen Mengen NO. TNF- α Aktivierung von BMDM induzierte eine mäßige Freisetzung von IL-6, aber nicht von NO. TNF- α - und IL-1 β -Sekretion wurde nach TNF- α -Stimulation nicht gemessen (n.g.). Die Stimulation von BMDM mit IL-4 zeigte gemessen an IL-6, TNF- α und NO ein ähnliches Profil wie ruhende BMDM. Alle ermittelten Konzentrationen sind MW (\pm SD) von wenigstens 5 unabhängigen Messungen. ***p < 0,001 bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu ruhenden Makrophagen (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test).

Aktivierung von BMDM durch...	IL-6 [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	IL-1 β [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	NO [μ mol/l]
ruhend	2,5 \pm 3,1	5,5 \pm 5,7	2,1 \pm 2,2	16,9 \pm 13	2,9 \pm 2,8
LPS/IFN- γ	1941 \pm 437 ***	1121 \pm 190 ***	59 \pm 31,7 ***	161,8 \pm 77,2 ***	25,63 \pm 3,3 ***
TNF- α	119 \pm 62,3 ***	n. g.	n. g.	25,23 \pm 9,5	0,8 \pm 0,4
IL-4	6,2 \pm 6,2	3,8 \pm 1,6	n. g.	n. g.	1,3 \pm 0,9

Um den zeitlichen Verlauf der Zytokin- und NO-Freisetzung von BMDM nach Aktivierung zu untersuchen, wurden BMDM in einer Zeitreihe von 1 Stunde bis 24 Stunden mit LPS/IFN- γ , dem intensivsten Stimulanz, inkubiert (Abb. 9). Eine Stunde nach Aktivierung der BMDM war nahezu keine IL-6- (0,9 \pm 1,6 pg/ml), IL-10- (5,4 \pm 4,4 pg/ml) und NO- (0,24 \pm 0,17 μ mol/l), bzw. nur eine geringe TNF- α - (61,25 pg/ml) Sekretion zu detektieren. Erst nach 6 Stunden war eine deutliche Konzentration an IL-6 (1412,3 \pm 345,56 pg/ml), TNF- α (787,7 \pm 299 pg/ml) und IL-10 (120 \pm 20,6 pg/ml) in den BMDM-Überständen nachweisbar. NO wurde zu diesem Zeitpunkt nicht gemessen. Der Zytokinspiegel war nach 24 Stunden weiter erhöht und die Freisetzung von NO (21,1 \pm 4 μ M) deutlich induziert. Somit benötigen die gemessenen Mediatoren mehr als 1 Stunde um in messbarer Konzentration im Kulturmedium vorzuliegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass IL-6, IL-10, NO und TNF- α in Kokultur keine schnellen Effekte im Minutenbereich vermitteln.

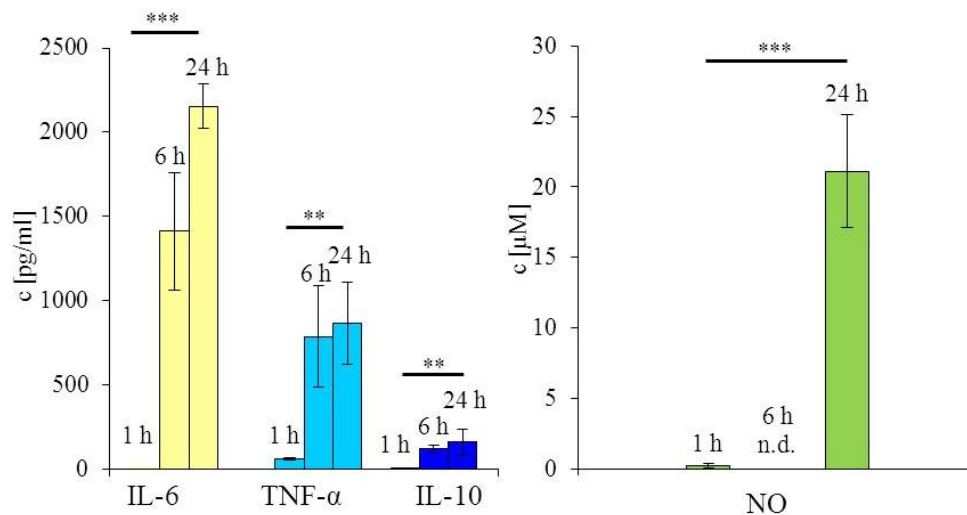


Abbildung 9 Zeitverlauf der Zytokin- und NO-Sekretion in BMDM-Monokulturen nach LPS/IFN- γ -Zugabe.

Nach 1-stündiger Stimulation der BMDM konnte fast kein IL-6, IL-10 und NO bzw. nur wenig TNF- α in den Kulturüberständen detektiert werden. Erst nach 6 Stunden LPS/IFN- γ Inkubation war die Zytokinfreisetzung deutlich erhöht (NO nicht gemessen). Die Stimulation der BMDM für 24 Stunden verstärkte die Sekretion von IL-6, TNF- α und IL-10 bzw. induzierte eine signifikante NO-Freisetzung. Alle ermittelten Konzentrationen sind Mittelwerte (\pm SD) von wenigstens 5 unabhängigen Messungen. **p < 0,01; ***p < 0,001 (Vergleich der 1 Stunden- mit den 24 Stunden Werten im Mann-Whitney-U-Test)

3.2 DRG-Neurone in Monokultur

DRG-Monokulturen sind in Abb. 10A (1 Tag in Kultur) und 10B (3 Tage in Kultur) dargestellt. Bei der Präparation der Zellen wurden die Ausläufer entfernt und wuchsen dann im Laufe von 3 Tagen wieder zu einem dichten Dendriten-Netzwerk aus. In Abb. 11A ist eine typische Größenverteilung von neuronalen Zellkörpern (350 Neurone aus 5 verschiedenen Präparationen) in Kultur dargestellt. Der Großteil der Neurone war klein bis mittelgroß und entsprach somit den Zellkörpern von unmyelinisierten C- und dünn myelinisierten A δ -Fasern.

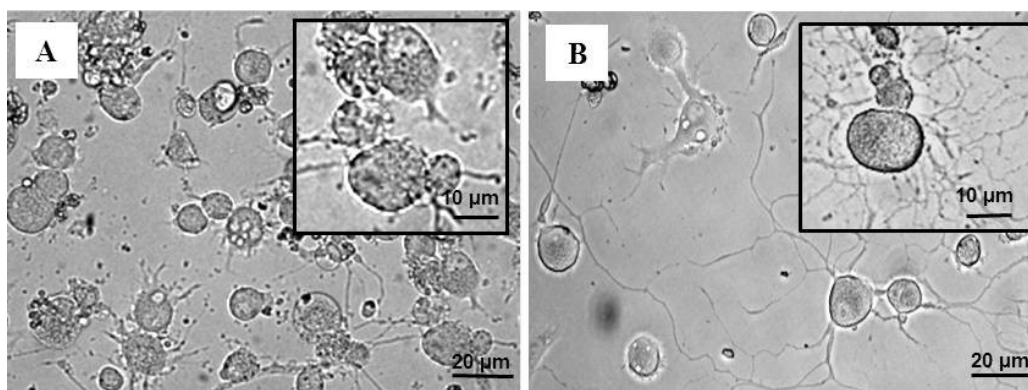


Abbildung 10 DRG-Neurone in Monokultur

10A DRG-Neurone besaßen bereits 1 Tag nach der Präparation kurze Ausläufer **10B** DRG-Neuronen-Kulturen am Tag 3 hatten ein Netzwerk mit langen Fortsätzen ausgebildet.

Cyclic AMP-dependent transcription factors 3 (ATF3) ist ein Transkriptionsfaktor, der für die neuronale Regeneration wichtig ist und somit *in vivo* als anerkannter Marker für Zellschädigung von Neuronen genutzt wird. Die ATF3-Markierung von Neuronen-Monokulturen (siehe Abb. 11C) zeigte, dass DRG-Neurone, Zellschädigungen regenerierten, die durch die Präparation erzeugt wurden. Allerdings war ATF3 bereits in $92,3 \pm 3,9\%$ (1 Tag in Kultur) bzw. in $84,5 \pm 5\%$ (4 Tage in Kultur) der Zellen hochreguliert (Abb. 11B), sodass es nicht möglich gewesen wäre, weitere Zellschädigungen infolge der Kokultivierung (z.B. durch Makrophagenprodukte) zu detektieren. Folglich ist ATF3 kein adäquater Marker für neuronale Zellschädigung in Kultur.

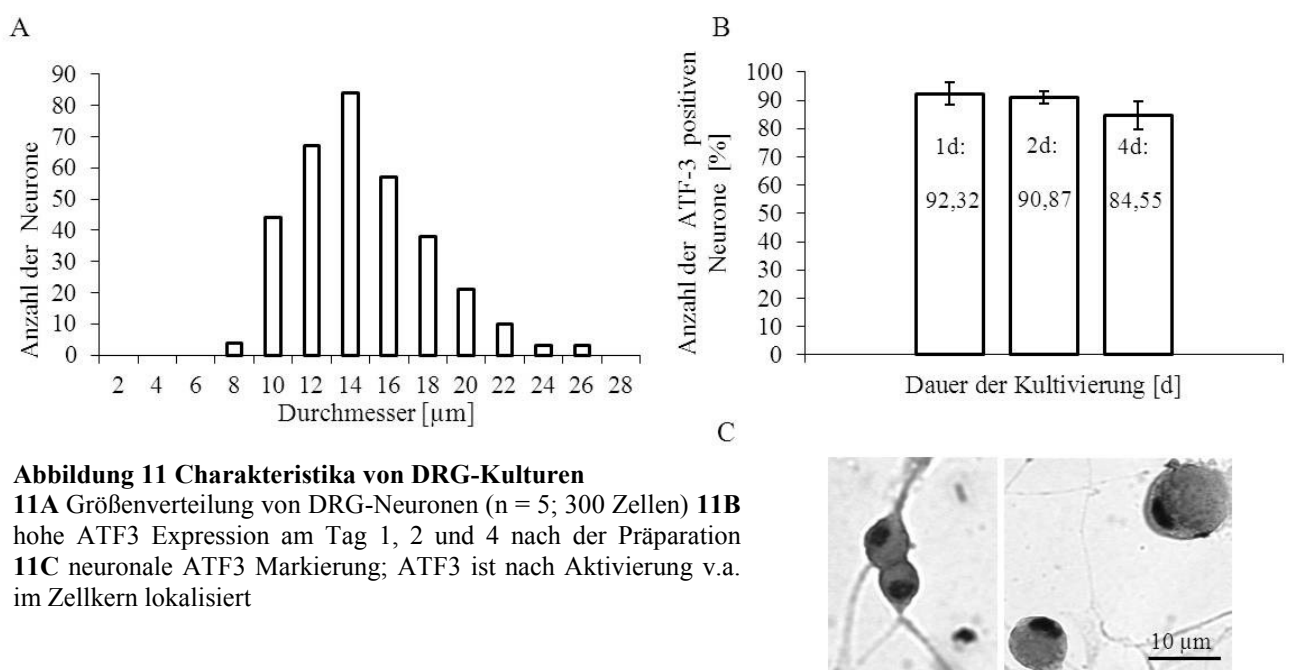


Abbildung 11 Charakteristika von DRG-Kulturen

11A Größenverteilung von DRG-Neuronen (n = 5; 300 Zellen) **11B** hohe ATF3 Expression am Tag 1, 2 und 4 nach der Präparation **11C** neuronale ATF3 Markierung; ATF3 ist nach Aktivierung v.a. im Zellkern lokalisiert

3.3 Kokultivierung von BMDM und DRG-Neuronen

3.3.1 Etablierung einer direkten und indirekten Kokultur

Zur isolierten Untersuchung der Kommunikation von Makrophagen und Neuronen wurden zwei Systeme der Kokultivierung etabliert. Im System der indirekten Kokultur (Abb. 12A, links) wuchsen BMDM und DRG-Neurone auf 2 verschiedenen Glasplättchen, aber in einer Petrischale, sodass sie über lösliche Mediatoren kommunizieren konnten. Hingegen im System der direkten Kokultur (Abb. 12A; rechts) wurden beide Zelltypen auf einem Glasplättchen kultiviert und konnten auch über Zellkontakte interagieren. BMDM und Neurone in direkter Kokultur sind in Abb. 12B (1 Tag in Kokultur) und 12C (3 Tage in

Kokultur) dargestellt. Die beiden Zelltypen sind hauptsächlich über ihre verschiedene Form und teils über ihre Größe unterscheidbar. Zur sicheren Identifizierung wurden DRG-Neurone in Kokultur mit einem Antikörper gegen Peripherin (Alexa 488; grün) markiert (Abb. 12D). Das dazugehörige Durchlichtbild (Abb. 12C) lässt zwar bereits vermuten, bei welchen Zellen es sich um Neurone handelt, aber erst die Peripherinmarkierung (Abb. 12D) macht es deutlich.

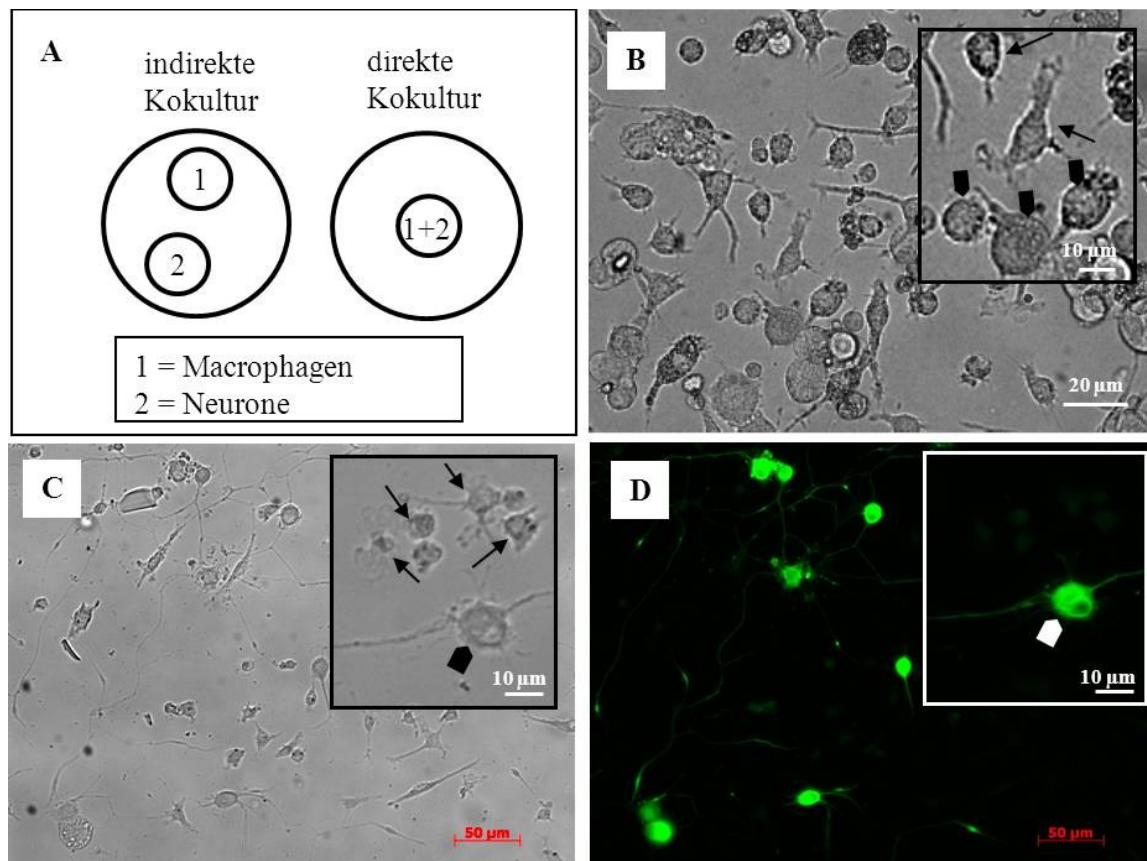


Abbildung 12 Zwei verschiedene Systeme zur Kokultivierung von DRG-Neuronen und BMDM.

12A Schema einer indirekten Kokultur (links): DRG-Neurone und BMDM kultiviert auf 2 verschiedenen Glasplättchen. Schema einer direkten Kokultur (12A/ rechts): BMDM und DRG-Neurone wachsen auf einem Glasplättchen. **12B** Direkte Kokultur 1 Tag und **12C** 3 Tage nach der Präparation. **12B/C** Pfeile zeigen auf Makrophagen; Pfeilköpfe weisen auf Neurone hin. **12D** Selektive Markierung von DRG-Neuronen in einer direkten Kokultur (siehe Durchlichtbild 12C zum Vergleich) mit einem Antikörper gegen Peripherin (markiert mit Alexa 488; grün).

3.3.2 Prinzip der Kokultur-Analyse im Calcium Imaging

Des Weiteren eignet sich die Analyse im Calcium Imaging zur funktionellen Unterscheidung von Neuronen und BMDM. Charakteristischerweise reagieren BMDM nicht mit einem zytoplasmatischen Calciumanstieg auf 50 mmol/l KCl, aber nach Zugabe von 1 mmol/l ATP kommt es zu einem schnellen Anstieg von Calcium in der Zelle (Abb. 13B) (Pelegri et al.,

2009; Ulmann et al., 2010). Alle vitalen DRG-Neurone reagieren hingegen auf KCl (Abb. 13C/13D) und bei einem Teil der Neurone bewirkte zusätzlich die Zugabe von ATP (Abb. 13D) einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Corrales et al., 2005; Bradbury et al., 1998). Abbildung 13E zeigt ein typisches Reaktionsmuster einer direkten Kokultur im Calcium Imaging-Versuch in welchem man BMDM (orange Kurve) und DRG-Neurone (blaue Kurve) gut unterscheiden kann. Der Anteil der reagierenden BMDM und DRG-Neurone auf ATP und KCl wurde in Abbildung 13F zusammengefasst. Neben der funktionellen Unterscheidung von BMDM und DRG-Neuronen, zeigten die Calcium Imaging-Daten, dass beide Zelltypen in Kokultur vital waren und ihre typischen Reaktionsmuster bewahrten.

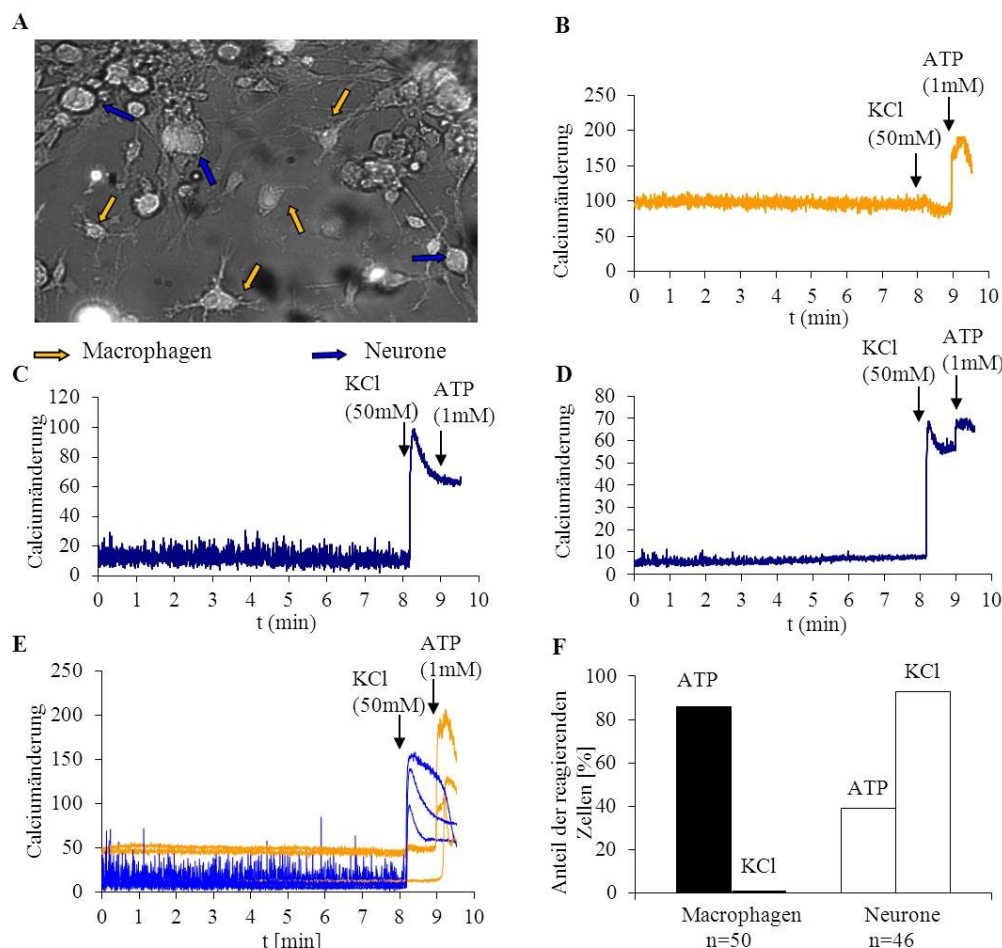


Abbildung 13 Prinzip der Kokultur-Analyse im Calcium Imaging

13A BMDM (rote Pfeile) und DRG-Neurone (blaue Pfeile) sind größtenteils über ihre Morphologie unterscheidbar. **13B** Zeigt eine typische Reaktion der Makrophagen auf 1 mmol/l ATP, aber keine Reaktion auf 50 mmol/l KCl **13C/13D** Alle vitalen Neurone reagieren auf KCl **13D** und einige zudem auf ATP. **13E** In direkter Kokultur sind diese verschiedenen Reaktionen nutzbar um BMDM und Neurone voneinander zu unterscheiden (orange Kurve = Makrophagen (n = 3); blaue Kurve = Neurone (n = 3); beide Zelltypen wurden zuvor morphologisch charakterisiert). **13F** Diagramm illustriert den Anteil von reagierenden BMDM und Neuronen auf ATP und KCl.

3.3.3 Zytokinproduktion in Kokultur

Zytokine und NO werden zum großen Teil, aber nicht nur, von Makrophagen produziert. Um erste Anhaltspunkte für eine Interaktion in Kokultur zu bekommen, wurde die Zytokin- und NO-Sekretion nach 24-stündiger LPS/IFN- γ -Stimulation in direkter und indirekter Kokultur im Vergleich zur BMDM-Monokultur und Neuronen-Monokultur mittels ELISA analysiert ($n = \text{mind. } 5$). In Neuronen-Monokulturen konnte eine deutliche Sekretion von IL-6 ($182 \pm 159,7 \text{ pg/ml}$) nachgewiesen werden, aber nur geringe Konzentrationen von TNF- α ($4,1 \pm 1,6 \text{ pg/ml}$), IL-10 ($27,7 \pm 24,2 \text{ pg/ml}$) und NO ($2,3 \pm 1,8 \text{ } \mu\text{mol/l}$). Trotz Stimulation der Neurone konnte keine IL-1 β -Produktion gemessen werden (siehe Tabelle 4; 1. Zeile). Die LPS/IFN- γ -Stimulation von BMDM bewirkte hingegen, wie unter 3.1.3 beschrieben, eine stärkere Induktion von IL-6 ($1941 \pm 437 \text{ pg/ml}$), TNF- α ($1121 \pm 190 \text{ pg/ml}$), IL-1 β ($59 \pm 31,7 \text{ pg/ml}$), IL-10 ($161,8 \pm 77,2 \text{ pg/ml}$) und von NO ($25,63 \pm 3,3 \text{ } \mu\text{mol/l}$) (siehe Tabelle 4; 2. Zeile) als bei Neuronen. Die Freisetzung der gemessenen Zytokine, sowie von NO waren weder in direkter noch in indirekter Kokultur signifikant verändert (siehe Tabelle 4; 3. + 4. Zeile) (Kruskal-Wallis-Test).

Tabelle 4 Vergleich der Zytokin- und NO-Konzentrationen in Überständen von Monokulturen und direkten bzw. indirekten Kokulturen nach 24-stündiger LPS/IFN- γ Stimulation ($n = \text{mind. } 5$).

Neuronen-Monokulturen sekretierten geringe Konzentrationen von IL-6, TNF- α , IL-10 und NO im Vergleich zu Makrophagen-Monokulturen. IL-1 β war nicht in Neuronen-Monokulturen, aber in Makrophagen-Monokulturen messbar. Der Vergleich der Konzentration von IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 und NO zwischen Makrophagen-Monokulturen, direkten und indirekten Kokulturen zeigte keinen signifikanten Unterschied

LPS/IFN- γ -Stimulation	IL-6 [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	IL-1 β [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]	NO [μM]
Neuronen-Monokulturen	$182 \pm 159,7$	$4,1 \pm 1,6$	0	$27,7 \pm 24,2$	$2,3 \pm 1,8$
Makrophagen-Monokulturen	1941 ± 437	1121 ± 190	$59 \pm 31,7$	$161,8 \pm 77,2$	$25,63 \pm 3,3$
direkte Kokultur	$1811,7 \pm 683$	$868 \pm 245,3$	$61,7 \pm 31,9$	$165 \pm 83,7$	$23,7 \pm 9,9$
indirekte Kokultur	$2003,7 \pm 710$	$1042 \pm 310,6$	$59,1 \pm 13,4$	$136,4 \pm 48,6$	$25,5 \pm 6,1$

3.3.4 Neuronaler Zelltod

3.3.4.1 Trypanblau Analyse in Kokulturen im Vergleich zu Neuronen-Monokulturen

Um zu untersuchen, ob Makrophagen die Vitalität von DRG-Neuronen in Kokultur beeinflussen, wurde Trypanblau zur Färbung sterbender Zellen genutzt. Abb. 14 zeigt wie der

Farbstoff in Zellen mit einer defekten Zellmembran eingedrungen ist und sie somit blau markiert. In Abb. 15A ist der Effekt der LPS/IFN- γ -Zugabe zu Neuronen-Monokulturen im Vergleich zu direkten und indirekten Kokulturen dargestellt ($n = 5 - 8$). Neuronen-Monokulturen (4 Tage) wiesen eine Mortalitätsrate von $11 \pm 1\%$ auf, welche durch die Zugabe von LPS/IFN- γ ($10,8 \pm 1\%$) für 2 Tage nicht beeinflusst wurde (von links: 1. + 2. Box). Die direkte Kokultivierung von DRG-Neuronen mit ruhenden Makrophagen reduzierte den Anteil von Trypanblau-positiven Neuronen auf $4 \pm 1,3\%$ (3. Box). Im Kontrast dazu induzierte die LPS/IFN- γ -Stimulation direkter Kokulturen eine erhöhte Mortalität der Neurone auf $27,9 \pm 6,8\%$ (4. Box). Solch ein starker Effekt von Makrophagen auf das Überleben der Neurone wurde in indirekten Kokulturen nicht beobachtet. Dort lag die Todesrate unabhängig der Stimulation bei $6 \pm 3,4\%$ bzw. $6,7 \pm 1,9\%$ (5. + 6. Box). Somit können LPS/IFN- γ -stimulierte BMDM DRG-Neurone signifikant schädigen bzw. ruhende BMDM haben die Fähigkeit den Anteil vitaler Neurone zu erhöhen, aber nur wenn sie in direkter Nähe kultiviert werden.

Abb. 15B zeigt, dass die Inkubation von Neuronen-Monokulturen mit TNF- α ($9,3 \pm 3,2\%$) oder IL-4 ($9,1 \pm 2\%$) ihre Überlebensrate nicht signifikant beeinflusste (1. - 3. Box). Im Unterschied dazu bewirkten durch TNF- α - ($2,3 \pm 0,2\%$) und IL-4- ($2,8 \pm 1,1\%$) stimulierte BMDM in direkter Kokultur, ähnlich wie ruhende Makrophagen, eine signifikante Senkung des Anteils Trypanblau-positiver DRG-Neurone (4. – 6. Box).

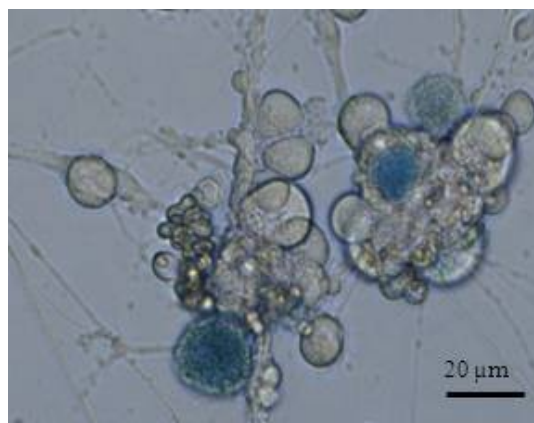


Abbildung 14 Beispiel einer Trypanblau-Färbung in Neuronen-Monokultur
(Neurone 4 Tage in Kultur und ab Tag 2 mit LPS/IFN- γ stimuliert)

Tote Zellen erscheinen blau, weil Trypanblau in sie eindringen konnte.

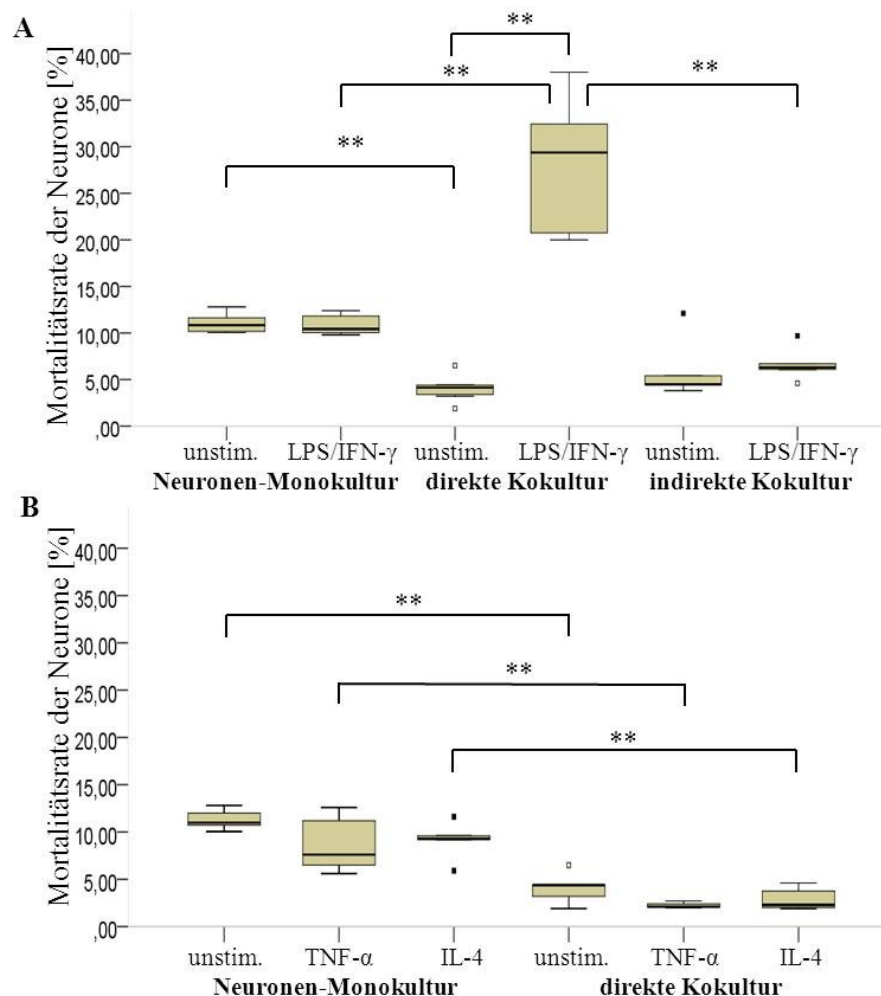


Abbildung 15 Trypanblau-Test zum Vergleich neuronaler Mortalitätsraten von Monokulturen und Kokulturen nach 48 stündiger unterschiedlicher Stimulation (n = 5 - 8)

(Beschreibung der Boxen jeweils von links nach rechts). **15A** In Neuronen-Monokulturen waren rund 11% der Zellen tot (= blau) unabhängig der Zugabe von LPS/IFN- γ . Unstimulierte direkte Kokulturen wiesen eine signifikant verringerte Trypanblau-Färbung auf, wohingegen die LPS/IFN- γ -Stimulation der BMDM einen signifikanten Anstieg bewirkte. In indirekten Kokulturen lag der Anteil toter Zellen um 6% unabhängig von der LPS/IFN- γ -Zugabe **15B** IL-4 und TNF- α hatten keinen Einfluss auf das Überleben der Neurone in Monokulturen. In indirekten Kokulturen führte die Aktivierung von BMDM mit IL-4 und TNF- α zu einer signifikanten Senkung der Mortalitätsrate. **p < 0,001 (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test)

3.3.4.2 Einfluss des von BMDM freigesetzten NO auf den neuronalen Zelltod in Kokultur

BMDM produzieren NO und es ist beschrieben, dass große Mengen an NO zytotoxisch wirken können (Clancy et al., 1995). Somit entstand die Vermutung, dass NO in direkten Kokulturen an der Erhöhung der neuronalen Mortalitätsrate beteiligt sein könnte. Abb. 16A zeigt, dass es eine deutliche Korrelation zwischen dem Anstieg der NO-Konzentration im Kulturüberstand und der Erhöhung der Todesrate von DRG-Neuronen gibt, aber nur in LPS/IFN- γ stimulierten direkten (blaue Vierecke) Kokulturen (nach 48 Stunden). Die Zugabe

von LPS/IFN- γ führte auch in indirekten Kokulturen (grüne Dreiecke) zu einem Anstieg der NO-Freisetzung (nach 48 Stunden), welcher aber nicht von einer erhöhten neuronalen Mortalitätsrate begleitet war. Unstimulierte direkte (gelbe Vierecke) und indirekte (schwarze Kreise) Kokulturen dienten als Kontrollen. Unter beiden Kulturbedingungen waren die NO-Sekretion und der Anteil toter Neurone sehr gering.

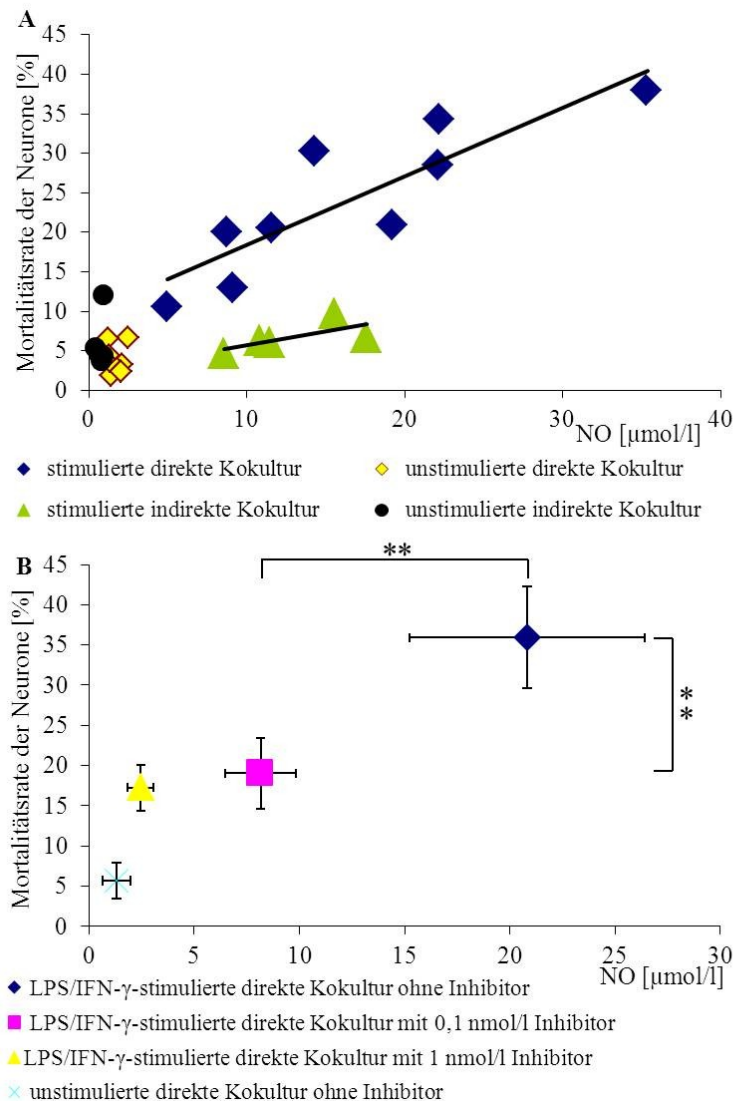


Abbildung 16 Korrelation der NO-Konzentration und der neuronalen Mortalitätsrate in Kultur.

16A Nur in direkter Kokultur bewirkte die LPS/IFN- γ -Stimulation (blaue Vierecke) einen Anstieg der neuronalen Mortalitätsrate parallel zur steigenden NO-Konzentration, aber nicht in indirekter Kokultur (grüne Dreiecke). **16B** Die Zugabe des iNOS Inhibitors Aminoguanidin Hydrochlorid induzierte eine signifikante Abnahme der NO-Freisetzung begleitet von einer Reduktion Trypanblau positiver Neurone. Bereits bei Zugabe von 0,1 nmol/l des Inhibitors, aber auch bei 1 nmol/l war der Effekt signifikant ($n = 5$). $**p < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

Um zu belegen, dass NO ein zentraler Mediator des erhöhten neuronalen Zelltodes war, wurde der selektive iNOS-Inhibitor Aminoguanidin Hydrochlorid zu direkten Kokulturen mit

LPS/IFN- γ koappliziert und für 2 Tage inkubiert. In Abb. 16B ist dargestellt, dass der iNOS Inhibitor konzentrationsabhängig (0,1/ 1 nmol/l) die NO-Konzentration reduziert. Parallel wurde auch die neuronale Mortalitätsrate signifikant verringert. 1 nmol/l Aminoguanidin Hydrochlorid senkte die NO-Konzentration fast auf das Niveau unstimulierter Kokulturen ab, aber die neuronale Mortalitätsrate reduzierte sich nicht bis auf das Niveau unstimulierter Kokulturen. Somit ist stark zu vermuten, dass hauptsächlich NO für den neuronalen Tod verantwortlich war. Jedoch werden von BMDM noch weitere Mediatoren produziert, welche Neurone in direkter Kokultur schädigen.

3.3.5 CGRP-Freisetzung in direkter Kokultur

Um zu analysieren, ob BMDM fähig sind DRG-Neurone in kurzer Zeit zu stimulieren, wurde mittels ELISA die CGRP-Konzentration in Überständen direkter Kokulturen mit der von Neuronen-Monokulturen (Angabe MW \pm SD) verglichen. In unstimulierten Kokulturen war nach 5 min eine basale CGRP-Sekretion von $1 \pm 2,1$ pg/ml und $17,7 \pm 11,6$ pg/ml nach 20 min Inkubation zu ermitteln. Weil bereits die basale CGRP-Produktion zwischen den Kulturen sehr schwankte, ist in Abb. 17A die CGRP-Freisetzung von je 7 unabhängigen Kulturen ohne Stimulation einzeln gepaart mit den Werten nach LPS/IFN- γ -Zugabe dargestellt. Mittelt man die dargestellten Einzelwerte, dann zeigte die Stimulation direkter Kokulturen für 5 min (um $64,88 \pm 24,7$ pg/ml) wie auch für 20 min ($116,2 \pm 73,5$ pg/ml) eine signifikante Erhöhung der CGRP-Konzentration in den Überständen in Bezug auf die basalen CGRP-Werte (Einzelwerte siehe Abb. 17A; blaue & rote Linien). Neurone in Monokultur (20 min) zeigten eine ähnliche basale Freisetzung ($29,1 \pm 13,9$ pg/ml) wie Neurone in unstimulierten Kokulturen, welche durch LPS/IFN- γ -Inkubation für 20 min um $20,1 \pm 21,7$ pg/ml erhöht wurde (Einzelwerte siehe Abb. 17A; gelbe Linie). Dieser Effekt ist aber weder signifikant noch in der Dimension wie die CGRP-Erhöhung unter Anwesenheit von BMDM. Makrophagen in Monokultur sezernierten kein CGRP (0 pg/ml). In Abb. 17B sind die gemittelten CGRP-Konzentrationen nach 1-stündiger LPS/IFN- γ -Inkubation in Neuronen-Monokulturen und direkten Kokulturen abzüglich ihrer basalen Produktion dargestellt (n = 7). Balken 1 und 2 (von links) zeigen, dass die Stimulation direkter Kokulturen ($70,43 \pm 37,18$ pg/ml) die CGRP-Sekretion signifikant mehr steigerte als in Neuronen-Monokulturen ($20,1 \pm 21,7$ pg/ml). Diese Daten zeigen, dass Mediatoren von LPS/IFN- γ -aktivierten Makrophagen notwendig waren, um die neuronale CGRP-Produktion zu steigern. Um zu testen, ob NO, ein typisches Sekretionsprodukt von M1-Makrophagen, einen Einfluss auf die CGRP-Freisetzung

besitzt, wurde der iNOS-Inhibitor Aminoguanidin Hydrochlorid genutzt. Der Vergleich von Balken 2 und 3 (Abb. 17B) zeigt, dass die Zugabe des iNOS-Inhibitors keinen Effekt auf die CGRP-Produktion bei 1-stündiger Koinkubation mit LPS/IFN- γ ausübte. Somit konnte gezeigt werden, dass BMDM im Kurzzeitfenster unabhängig von NO die neuronale Aktivität erhöhen können, gezeigt an der Erhöhung der neuronalen CGRP-Freisetzung.

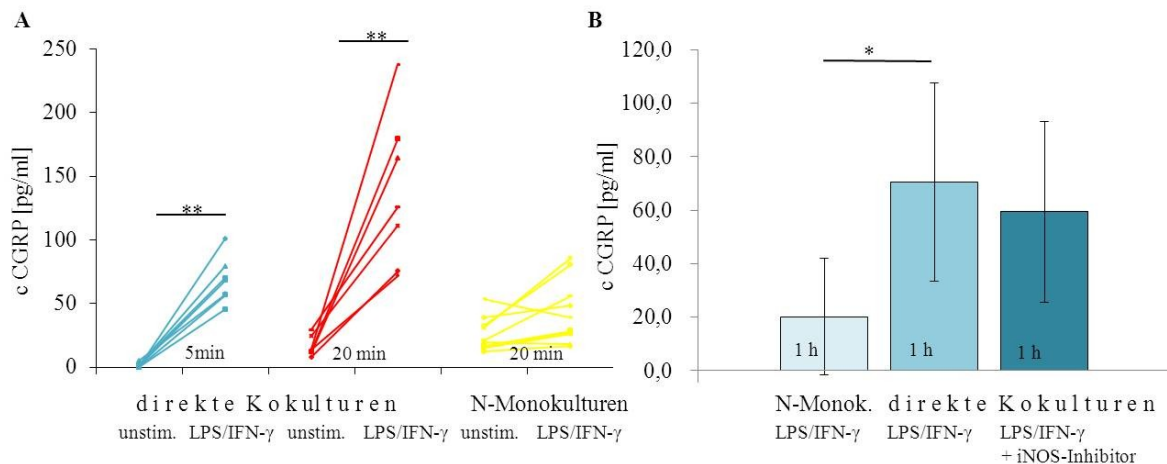


Abbildung 17 CGRP-Freisetzung von DRG-Neuronen in LPS/IFN- γ -stimulierten direkten Kokulturen und Neuronen-Monokulturen im Vergleich

17A Einzelwerte von je 7 unstimulierten direkten Kokulturen und Neuronen-Monokulturen mit geringer basaler CGRP-Konzentration (jeweils linke Randpunkte der Linien) bei Analyse der Überstände nach 5 oder 20 min. LPS/IFN- γ -Stimulation (5 oder 20 min) erhöhte die CGRP-Freisetzung direkter Kokulturen signifikant (jeweils rechte Randpunkte der Linien). Neuronen-Monokulturen zeigten nach 20 min Stimulation eine geringe, aber nicht signifikante Konzentrationssteigerung. Makrophagen sezernieren kein CGRP unter den experimentellen Voraussetzungen **17B** Die gemittelte CGRP-Freisetzung abzüglich der basalen Freisetzung ist nach 1-stündiger LPS/IFN- γ -Stimulation in direkten Kokulturen (2. Balken) signifikant höher als in Neuronen-Monokulturen (1. Balken) ($n = 7$). Die gleichzeitige Inkubation mit dem iNOS-Inhibitor Aminoguanidin Hydrochlorid zeigte keinen Effekt auf die CGRP-Sekretion in stimulierten direkten Kokulturen (3. Balken). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test zum Gruppenvergleich; Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben)

3.3.6 Modulation der Proliferationsrate von BMDM

3.3.6.1 Proliferation von BMDM in Monokultur und direkter Kokultur

Es gibt Hinweise dafür, dass Makrophagen im Verlauf der AIA in die DRGs über die Blutgefäße einwandern (Segond von Banchet et al. 2009). Um der Hypothese nachzugehen, dass DRG-Neurone die Anzahl der Makrophagen im DRG über Erhöhung der Zellteilung beeinflussen können, wurde ein Proliferationsassay mit BrdU in Kokultur und zum Vergleich in Makrophagen-Monokultur in einem Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt ($n = 6$). In Makrophagen-Monokulturen (Abb. 18A) wurde eine basale Proliferationsrate von $14,1 \pm 3,4\%$ (Abb. 18C; 1. Balken) ermittelt. Die Zugabe von M-CSF zu BMDM diente als

Positivkontrolle für die Funktionalität des Assays. Wie in der Literatur bereits beschrieben (Gangoiti et al., 2007) erhöht M-CSF die Proliferationsrate von Makrophagen signifikant (2. Balken: $26,5 \pm 5,7\%$). Es sollte getestet werden, ob Capsaicin oder KCl Neurone derart aktivieren können, dass diese in Kokultur die Vermehrung von Makrophagen regulieren. Allerdings zeigte sich in BMDM-Monokulturen, dass die Zugabe von KCl bereits einen direkten Einfluss auf Makrophagen ausübt, indem ihre Proliferationsrate signifikant reduziert wurde (3. Balken: $4,3 \pm 0,6\%$). Capsaicin hingegen übte keinen Effekt auf die Proliferation in Monokultur aus (4. Balken: $10,1 \pm 3,8\%$). Abb. 18D zeigt, dass in dem Randbereich der Glasplättchen (kurz: „Rand“), in dem keine Neurone wuchsen, die Proliferationsrate der Makrophagen in der gleichen Dimension wie in Makrophagen-Monokulturen lag (Vergleich 1. & 2. Balken: $13,4 \pm 2,7\%$). Im Mittelbereich der Glasplättchen (kurz: „Mitte“) befanden sich nicht nur Makrophagen, sondern auch Neurone (Abb. 18B). Hier war die Proliferationsrate hingegen im Vergleich zur Monokultur signifikant gesteigert (3. Balken: $34,7 \pm 1,6\%$). Eine niedrige Proliferationsrate von $14,7 \pm 3,8\%$ (4. Balken) in indirekter Kokultur untermauert die Annahme, dass die Proliferationsrate abhängig war von der direkten Nachbarschaft der DRG Neurone. In Abb. 18E ist zu sehen, dass die signifikante Steigerung der BrdU-positiven Zellen im Bereich „Mitte“ im Vergleich zum „Rand“ (1. & 2. Balken) durch die Zugabe von Capsaicin unverändert blieb (3. & 4. Balken: $10,2 \pm 3,2\%$ & $30,6 \pm 2,7\%$). Ähnlich wie in Monokultur, führt auch am „Rand“ der Kokultur die Zugabe von KCl (5. Balken: $4,1 \pm 0,5\%$) zu einer Verringerung der BrdU-positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Zudem war in der „Mitte“ direkter Kokulturen mit KCl-Inkubation (6. Balken: $13,4 \pm 2,4\%$) im Vergleich zur „Mitte“ unstimulierter Kokulturen die Proliferationsrate der BMDM deutlich gesenkt. In Bezug auf den „Rand“ des „KCl“ Plättchens ist der Anteil der BrdU-markierten Zellen allerdings auf einen Wert erhöht, der der basalen Proliferationsrate entsprach. KCl hat folglich einen direkten Proliferationshemmenden Einfluss auf Makrophagen, der im Kontakt mit Neuronen aber zum Teil kompensiert wird. DRG-Neurone bewirken bereits in unstimulierter Kokultur eine Erhöhung der Proliferationsrate von BMDM, aber nur wenn sie im direkten Kontakt miteinander stehen (Bereich „Mitte“).

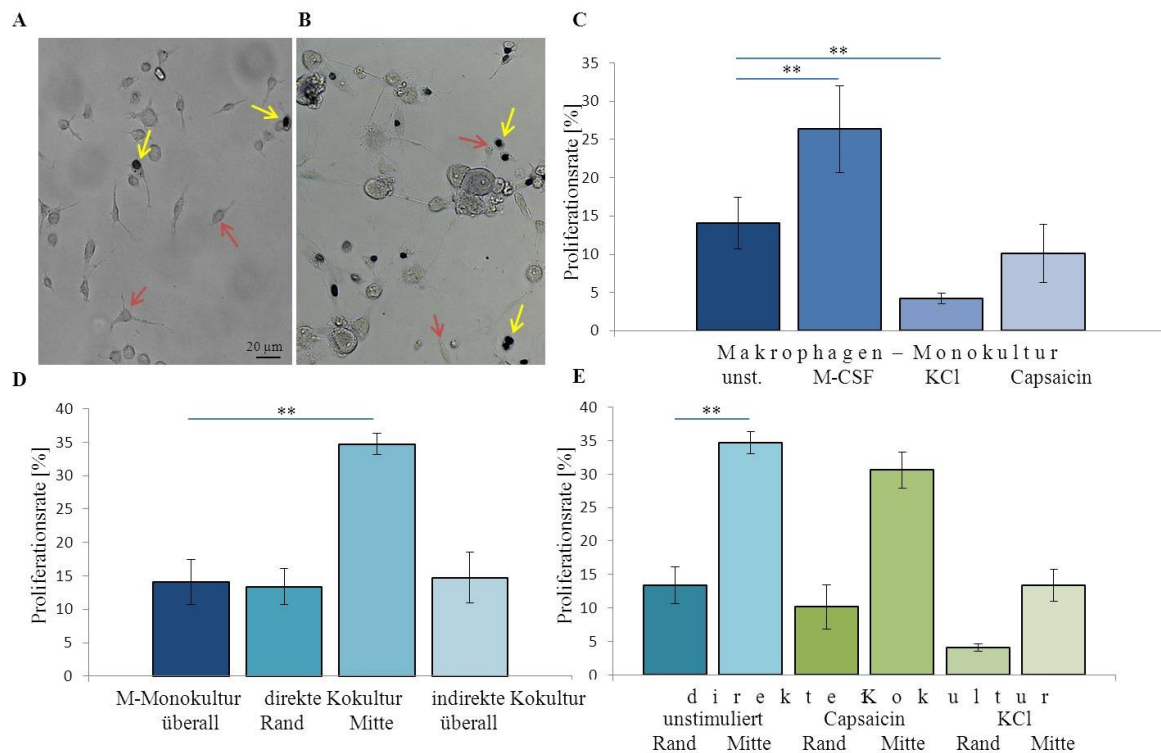


Abbildung 18 Proliferationsrate von BMDM in Monokultur und direkter Kokultur mit KCl- oder Capsaicin-Stimulation und im Vergleich zur indirekten Kokultur nach 24 Stunden (n = 6)

18A BrdU-positive (siehe blaue Pfeile) und BrdU-negative (siehe rote Pfeile) BMDM in unstimulierter Monokultur **18B** BrdU-Markierung in direkter Kokultur **18C** BMDM-Monokulturen: Die basale Proliferationsrate (1. Balken) wurde über M-CSF signifikant hochreguliert (= Positivkontrolle; 2. Balken). KCl hemmt die Proliferation der Makrophagen direkt (3. Balken) und Capsaicin hatte keinen Effekt auf die Vermehrungsrate. **18D** Am „Rand“ direkter Kokulturen ist die BrdU-Markierung vergleichbar mit der basalen Proliferationsrate. Aber im Bereich „Mitte“ waren signifikant mehr BrdU-positive Zellen zu erkennen. Bei indirekten Kokulturen (4. Balken) entsprach die Vermehrungsrate dem basalen Wert. **18E** Erhöhung der Proliferationsrate im Bereich „Mitte“ im Vergleich zum „Rand“ (1. & 2. Balken) war durch Capsaicin (3. & 4. Balken) unbeeinflusst. KCl senkte den Anteil proliferierender BMDM am „Rand“ stärker als im Bereich „Mitte“ (5. & 6. Balken). **p < 0,01 (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test)

3.3.6.2 Einfluss verschiedener TNF- α Inhibitoren und des iNOS Inhibitors in direkter Kokultur auf die Proliferationsrate von Makrophagen im Bereich „Mitte“

Um herauszufinden, welche Mediatoren in der „Mitte“ direkter Kokulturen die Proliferationsrate der BMDM erhöhten, wurden Inhibitoren für TNF- α und NO in Kombination mit BrdU inkubiert (n = 5/6). Die getesteten Inhibitoren übten keinen Effekt auf die Proliferationsrate in BMDM-Monokulturen aus (nicht dargestellt). Etanercept, das auch membranständiges TNF- α bindet und blockiert, hatte keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation der Makrophagen in Kokultur (Abb. 19; 1. Spalte (Median \pm SD): 31,4 \pm 7,5%). Hingegen bewirkte der Rezeptorantagonist gegen TNFR1 (Abb. 19; 2. Spalte: 22,4 \pm 5,8%), aber nicht der gegen TNFR2 (Abb. 19; 3. Spalte: 30,7 \pm 4%), eine signifikante Reduktion der proliferierten Makrophagen. Allerdings wurde die basale Proliferationsrate nicht erreicht, sodass der Effekt

von TNF- α über TNFR1 nur einer von mehreren Signalwegen sein kann, der die Zellvermehrung in Kokultur fördert. Zudem zeigte die Stimulation von BMDM-Monokulturen mit TNF- α (10 nmol/l) keine Veränderung der Proliferationsrate ($12,3 \pm 2,4\%$; nicht dargestellt), da es vermutlich nur kombinatorisch z.B. mit M-CSF wirkt (Guilbert et al.; 1993). Aminoguanidin Hydrochlorid, das die Produktion des flüchtigen Signalmoleküls NO hemmt, hatte keine signifikante Wirkung auf die Vermehrungsrate der BMDM in direkter Kokultur (Abb. 19; 4. Spalte: $29,6 \pm 5\%$). Von den getesteten Inhibitoren und Antagonisten hatte somit nur der TNFR1-Rezeptorantagonist einen hemmenden Effekt auf die Proliferationsrate in direkter Kokultur.

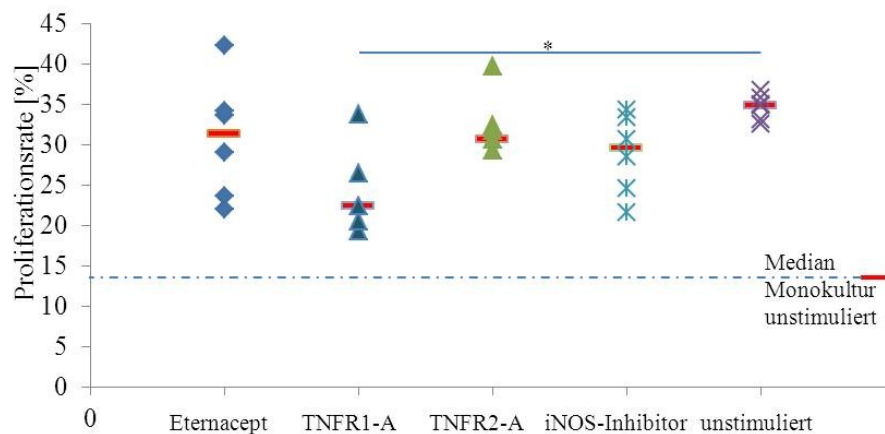


Abbildung 19 Proliferationsrate von BMDM in der „Mitte“ direkter Kokulturen in Abhängigkeit von TNF- α und NO (n = 5/6)

Der rote Strich entspricht dem Median. Etanercept zeigte keinen wesentlichen Effekt (1. Spalte). Die Zugabe des Antagonisten gegen TNFR1 (TNFR1-A; 2. Spalte), aber nicht gegen TNFR2 (TNFR2-A; 3. Spalte), reduzierte die Proliferationsrate in der „Mitte“ direkter Kokulturen signifikant. Zugabe des iNOS-Inhibitors (4. Spalte) veränderte nicht den Anteil BrdU-positiver BMDM im Vergleich zur „Mitte“ unstimulierter Kokulturen (5. Spalte). *p < 0,05 (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test)

3.4 Analyse des Expressionsmusters von DRG-immigrierten Makrophagen und ihrer potentiellen Rolle im Verlauf der AIA

3.4.1 Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Makrophagentypen *in vitro*

Mit dem Ziel die verschiedenen BMDM-Typen zu charakterisieren, wurden Antikörper gegen IL-6, iNOS, Cyclooxygenase-2 (COX-2) (proinflammatorisch) und Arg1 (antiinflammatorisch) *in vitro* getestet (Abb. 20). Zum Interspeziesvergleich wurden BMDM aus Maus (Abb. 20A) und Ratte (Abb. 20B) genutzt, wobei keine Unterschiede in ihrem Expressionsmuster festgestellt wurden. Die Markierung mit dem IL-6-Antikörper verlief nur

auf Maus-Makrophagen erfolgreich. Ruhende BMDM exprimierten keine der getesteten Marker (Abb. 20A/20B; 1. Reihe).

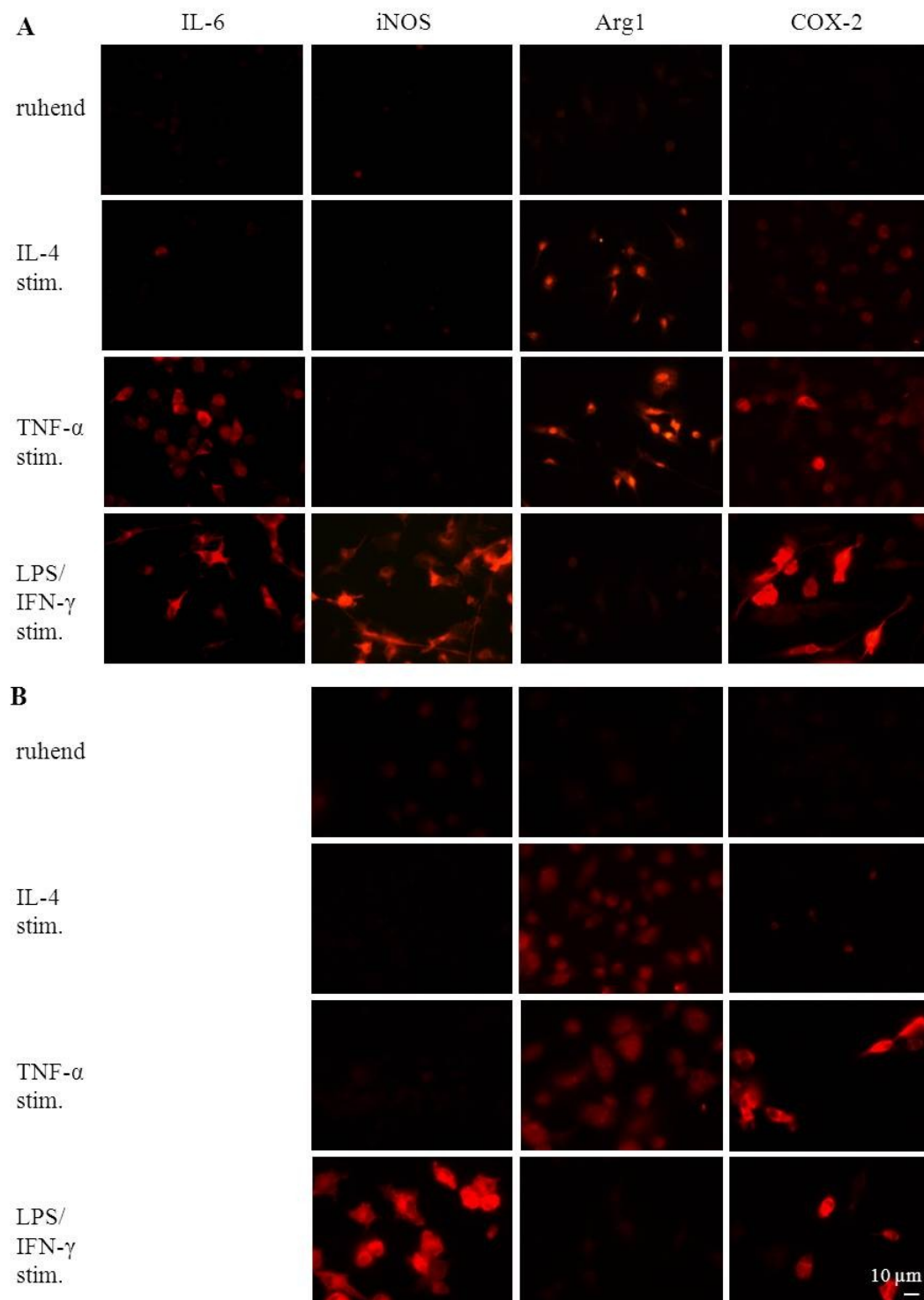


Abbildung 20 Expressionsmuster von BMDM (20A Maus; 20B Ratte) nach verschiedenen Aktivierungsarten
20A/20B Ruhende Makrophagen waren negativ für alle getesteten Marker (1. Reihe). IL-4 stimulierte BMDM waren deutlich Arg1 und schwach COX-2 positiv (2. Reihe). TNF- α aktivierte BMDM exprimierten auch Arg1 und COX-2. Bei Maus-BMDM (20A) wurde zudem die Expression von IL-6 nachgewiesen (3. Reihe). Auf BMDM-Kulturen der Ratte (20B) funktionierte der IL-6 Antikörper nicht. LPS/IFN- γ stimulierte BMDM waren IL-6 (20A), iNOS und COX-2 positiv, aber negativ für Arg1 (20A/20B; 4. Reihe).

IL-4 aktivierte M2-Makrophagen waren deutlich positiv für Arg1 und zum Teil positiv für COX-2 (2. Reihe). Über TNF- α und LPS/IFN- γ stimulierte BMDM zeigten, typisch für proinflammatorische M1-Makrophagen, eine erhöhte Expression von IL-6 und COX-2 (3. & 4. Reihe). Nur mit LPS/IFN- γ -stimulierte BMDM exprimierten iNOS (4. Reihe). Die Zugabe von TNF- α führte stattdessen zu einer Induktion von Arg1 (3. Reihe), welche mit iNOS um das gleiche Substrat konkurriert. Es konnte folglich gezeigt werden, dass sich die 4 getesteten Marker für die Unterscheidung der verschiedenen Makrophagentypen eignen (n = 5).

3.4.2 DRG-immigrierte Makrophagen sind nicht aggressiv, aber potentiell pronozizeptiv

Wie in Abb. 21 illustriert, waren in DRG-Schnitten gesunder Mäuse (21A) und Ratten (21C) keine Makrophagen zu sehen, aber nach Induktion einer AIA konnten Makrophagen identifiziert werden (Abb. 21B/21D). Auf Mausgewebe wurde der Marker Iba1 genutzt, da alle anderen getesteten Antikörper wie z.B. anti-CD68, anti-CD11b und anti-F4/80 eine zu starke Anfärbung der Neurone sowohl im Paraffin- als auch auf Kryoschnitten zeigten (siehe 3.5). In Abb. 21B ist die Iba1 Markierung von Makrophagen spezifisch in den lumbalen DRGs der Maus dargestellt, wobei erst am Tag 7 der AIA Iba1-positive Zellen detektiert wurden. Bei Ratten hingegen zeigte der Antikörper ED1 eine Immigration von Makrophagen in die DRGs am Tag 1, 3 und 7 und somit in der gesamten akuten Phase der AIA. Es konnte in beiden Spezies, mit den beschriebenen Markern, eine bilaterale Immigration von Makrophagen in die lumbalen DRGs gezeigt werden. Aber bei der AIA der Maus scheint das Zeitfenster der Einwanderung nach hinten verschoben zu sein.

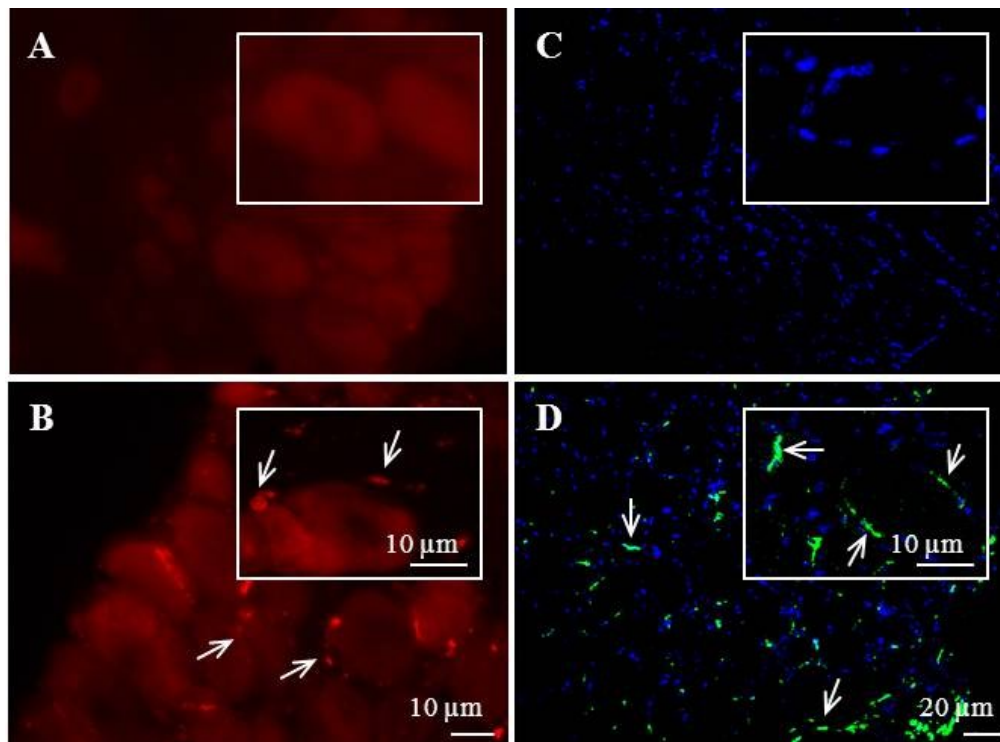


Abbildung 21 Markierung von Makrophagen in lumbalen DRG-Schnitten

21A In gesunden Mäusen sind keine Iba1-positive Makrophagen (Cy3 = rot) sichtbar **21B** Aber 7 Tage nach Induktion einer AIA umgeben Iba1-positive Zellen die Neuronen Somata. **21C/D** Bei Ratten zeigte der Makrophagenmarker ED1 (Alexa 488 = grün) ein ähnliches Ergebnis. Hoechst 34580 (= blau) diente der Kontrastierung der Nukleoli **21C** Fast keine ED1-Markierung im gesunden Tier. **21D** Aber viele ED1-positive Zellen 3 Tage nach AIA-Induktion.

Die *in vitro* getesteten Antikörper (siehe 3.4.1) iNOS, Arg1, COX-2 und IL-6 dienten als Werkzeuge zur Charakterisierung der Makrophagen im DRG der Ratte 3 Tage nach AIA-Induktion (n jeweils = 5). Analysiert wurde, ob diese Antikörper Doppelmarkierungen mit dem Makrophagenmarker ED1 (Alexa 488 = grün) aufwiesen. Abb. 22A zeigt einfarbig grüne Zellen neben den Neuronen, sodass iNOS (Cy3 = rot) nicht in den ED1-positiven Zellen exprimiert war. Stattdessen ist an der rot-grünen Doppelmarkierung der Neuronen-umgebenden Zellen eine Arg1-Expression der Makrophagen (Cy3) erkennbar (Abb. 22B). COX-2 konnte nicht in ED1-positiven Makrophagen detektiert werden (Abb. 22C). Die gelbe Fluoreszenz (Abb. 22D), die bei der Überlagerung von rot und grün entsteht, zeigt hingegen, dass IL-6 (Cy3) in einem Teil der Makrophagen exprimiert wurde. Abgesehen von der fehlenden COX-2-Expression der Makrophagen im DRG, weist ihr Expressionsmuster darauf hin, dass die DRG-immigrierten Makrophagen dem, mit TNF- α stimulierten M1-Makrophagentyp *in vitro* entsprechen. Die Antikörperanalyse zeigt, dass es sich um pro-inflammatorische (IL-6-positive) und nicht aggressive (Arg1-positive; iNOS-negative) Makrophagen im DRG der Ratte handelte.

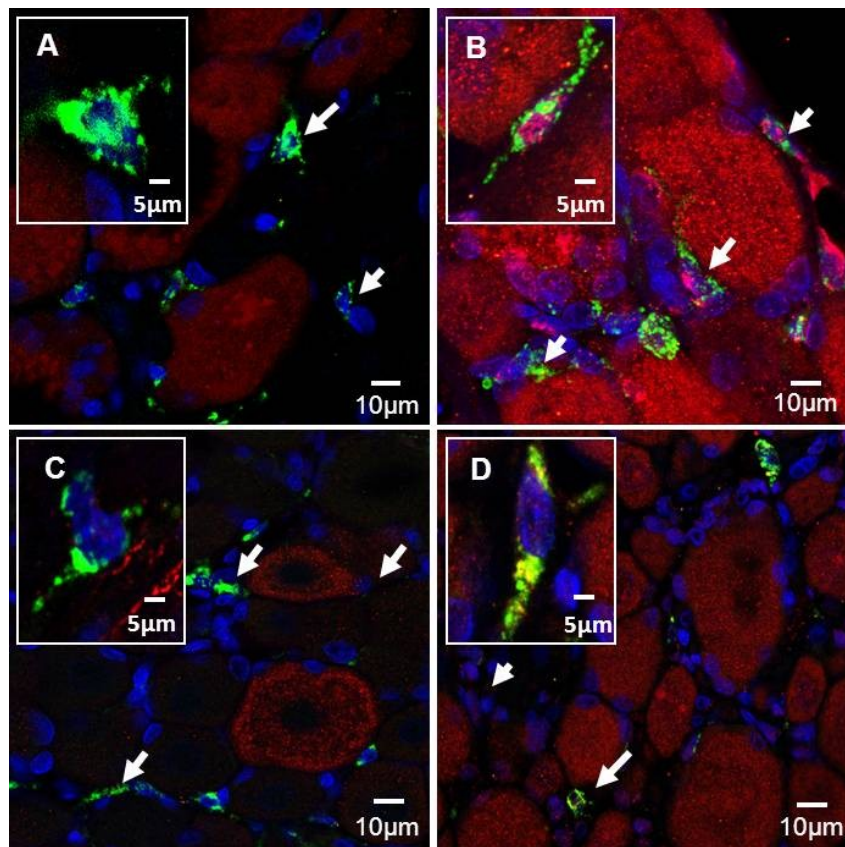


Abbildung 22 Charakterisierung von Makrophagen in den DRGs 3 Tage nach AIA-Induktion (Ratte)
22A ED1-positive Makrophagen (Alexa 488 = grün) zeigen keine Doppelmarkierung mit iNOS (Cy 3= rot). **22B** Alternativ wird Arg1 (Cy3) in Makrophagen exprimiert. **22C** Die grünen Makrophagen sind negativ für COX-2 (Cy3). **22D** IL-6 (Cy3) ist mit ED1 kolokalisiert. Überlagerung von rot und grün resultiert in gelber Fluoreszenz. Weiße Pfeile zeigen zu DRG-immigrierten Makrophagen. Zellkerne sind mit Hoechst 34580 (= blau) markiert.

3.4.3 Stimulation von DRG-Neuronen in vitro mit IL6/sIL6R

Davon ausgehend, dass DRG-immigrierte Makrophagen IL-6 exprimieren (Abb. 22D), sollte im *in vitro* Modell getestet werden, ob IL-6 die neuronale Aktivität beeinflussen kann. Dazu wurde die CGRP-Freisetzung nach 20 minütiger Inkubation in DRG-Überständen gemessen. Die alleinige Stimulation mit KCl steigerte die CGRP-Sekretion bereits um $41,6 \pm 22,7$ pg/ml (Abb. 23; 1. Balken) indem es die neuronale Depolarisation induzierte. Alle folgenden Signifikanzangaben beziehen sich auf die Steigerung in Bezug auf „nur KCl“. Die Zugabe von IL-6 und dem löslichen IL-6 Rezeptor (soluble IL-6 receptor = sIL-6R; beides 180 ng/ml) alleine hatte keinen Effekt auf die CGRP-Freisetzung von Neuronen-Monokulturen (Abb. 23; 2. „Nicht-Balken“), aber in Kombination mit KCl. KCl erhöht in Kombination mit 90 pg/ml IL-6/sIL-6 (Abb. 23; 4. Balken: $138,9 \pm 47,3$ pg/ml) und 180 pg/ml IL-6/sIL-6R (Abb. 23; 5. Balken: $166,5 \pm 52,4$ pg/ml) die CGRP-Konzentration in Kultur signifikant, aber nicht bei 45 pg/ml IL-6/sIL-6R. Es zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, aber mit geringeren

Konzentrationssteigerungen, nach Zugabe von 90 pg/ml IL-6 (Abb. 23; 7. Balken: $95,9 \pm 32$ pg/ml) oder 180 pg/ml IL-6 (beides ohne sIL-6R) (Abb. 23; 8. Balken: $122,4 \pm 46,2$ pg/ml) und KCl zu Neuronen-Monokulturen. Sogar die Inkubation mit sIL-6R (ohne IL-6) und KCl steigerte die CGRP-Freisetzung signifikant, aber erst bei 180 ng/ml sIL6R (Abb. 23; 11. Balken: $145,1 \pm 50$ pg/ml). Somit können IL-6/sIL-6R zwar nicht allein, aber in Kombination mit KCl konzentrationsabhängig die CGRP-Freisetzung von DRG-Neuronen stimulieren

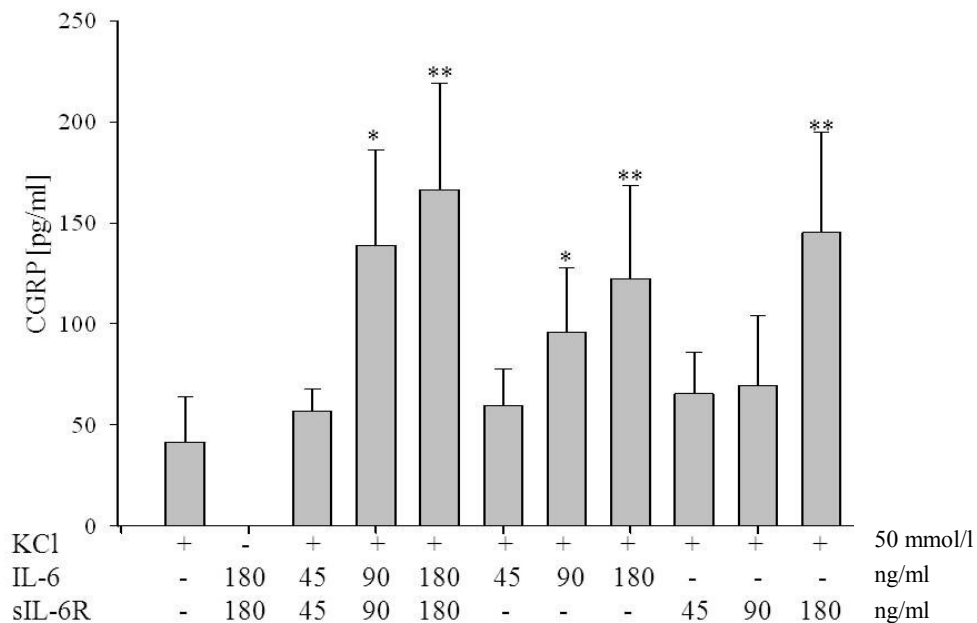


Abbildung 23 CGRP-Freisetzung von DRG-Neuronen in Kultur (1-2 Tage) abhängig von KCl, IL-6 und sIL6R

Von den dargestellten CGRP-Konzentrationen (Mittelwerte \pm SD; $n = 5$) wurde die basale Freisetzung in derselben Zeit (20 min) abgezogen. Alle Signifikanzangaben beziehen sich auf „nur KCl“. KCl allein (1. Balken), aber nicht nur die Zugabe von IL-6/sIL-6R (2. „Nicht-Balken“) erhöhte die CGRP-Konzentration in Kultur. Stimulation mit 90 ng/ml IL-6/sIL-6R und KCl (4. Balken) erhöhte die neuronale CGRP-Freisetzung signifikant. Auch ohne sIL-6R war die CGRP-Erhöhung bei 90 ng/ml IL-6 (und KCl) (7. Balken) signifikant. Hingegen war ohne IL-6, die höchste Konzentration des sIL-6R (und KCl) (letzter Balken) für einen deutlichen Effekt notwendig. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test)

3.5 Neuronale Anfärbungen mit Immunmarkern

3.5.1 CD68 Anfärbungen im DRG, Rückenmark und in Zellkultur

ED1 ist ein etablierter Marker für Makrophagen im DRG der Ratte (Abb. 24D), sodass für Mausgewebe sein Analogon CD68 etabliert werden sollte. ED1 markiert keine Neurone im DRG, sondern ausschließlich Makrophagen. Der Test von CD68 (Wirt Ratte; Serotec) zeigte eine deutliche Anfärbung von BMDM in Monokultur (Abb. 8A), die in der Kontrolle ohne 1. Antikörper (Abb. 8D) nicht zu sehen war. In direkter Kokultur (Abb. 24A) sowie in DRG-

Schnitten von gesunden (Abb. 24B) und AIA-erkrankten (nicht dargestellt) Mäusen markierte CD68 zudem DRG-Neurone. Wobei er nur einen Teil der DRG-Neurone anfärbte und Satellitenzellen unmarkiert ließ. Der Test im Rückenmark ergab ein ähnliches Bild. Kontrollanfärbungen ohne 1. Antikörper zeigten keine Markierung der Motoneurone (Abb. 24C), aber bei Anwesenheit von CD68 (Wirt: Ratte; Serotec) waren Neurone angefärbt (Abb. 24D). Die Markierung erschien nicht wie eine unspezifische Anlagerung des Antikörpers an alle Zellen, sondern wie eine selektive Anfärbung von Makrophagen (*in vitro*) und Neuronen (*in vitro und in vivo*).

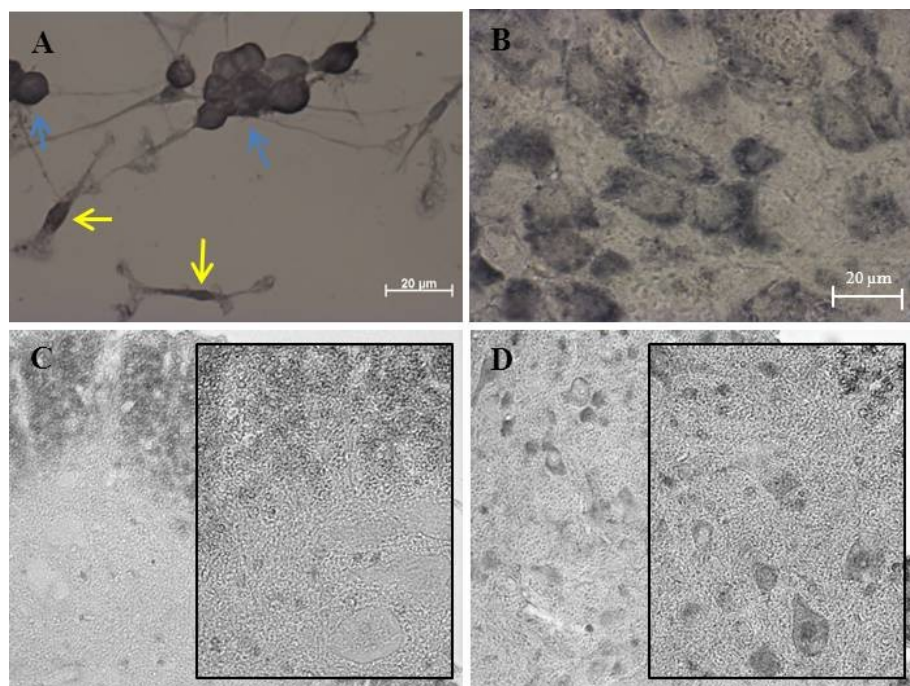


Abbildung 24 CD68-Markierung (Wirt: Ratte, Serotec) neuronaler Zellen in der Maus

24A Gleiche Intensität der Markierung von BMDM (gelber Pfeil) und DRG-Neuronen (blauer Pfeil) in Kokultur mit CD68. **24B** In DRG-Schnitten gesunder Mäuse erfolgte eine CD68 Markierung vieler Neurone. **24C** Die Kontrolle ohne CD68 Antikörper zeigt, dass es sich um keine unspezifische Bindung des 2. Antikörpers im Rückenmark handelte. **24D** Aber mit dem CD68 Antikörper waren Motoneurone im Rückenmark gesunder Mäuse angefärbt.

Wie in der Literatur beschrieben, wurden häufig Kryoschnitte genutzt, um Makrophagen im Gewebe der Maus mit CD68 oder anderen Immunmarkern zu markieren (Kim et al., 2011). Um zu prüfen, ob die Bindung von CD68 an Neurone ein methodisches Problem bei der Markierung von Paraffinschnitten darstellte, wurden zwei CD68-Antikörper (Wirt: Ratte; Abcam & Wirt: Kaninchen; Abcam; siehe Tabelle 1) vergleichend auf Paraffin- und Kryoschnitten getestet. Beide Antikörper markierten deutlich Zellen in der Milz (= Positivkontrolle) unabhängig der Einbettungsart (Abb. 25A). Es wurden wiederum nicht alle

Zellen der Milz markiert, sondern nur die typischen Bereiche in denen Makrophagen lokalisiert sind, was auf eine Spezifität des Antikörpers hinweist. Die Anfärbung von Ganglien-Kryoschnitten gesunder Mäuse mit CD68 (Wirt: Ratte; Abcam) zeigte, genauso wie in Paraffinschnitten (nicht dargestellt), nur eine starke Fluoreszenz (rot) der Neurone (Abb. 25B). Hingegen erkennt man in Abb. 25C, dass der Antikörper CD68 (Wirt: Kaninchen; Abcam) neben der deutlichen neuronalen Markierung auch kleine Makrophagen-ähnliche Zellen in den DRGs anfärbt. Die Anfärbung von Neuronen mit dem Immunmarker CD68, wurde mit 3 verschiedenen Antikörpern verschiedener Hersteller reproduziert. Die Antikörper markieren Neurone und Makrophagen in der Zellkultur, Neurone im Rückenmark und den DRGs und Makrophagen in der Milz, sodass die Vermutung besteht, dass auch Neurone CD68 exprimieren könnten.

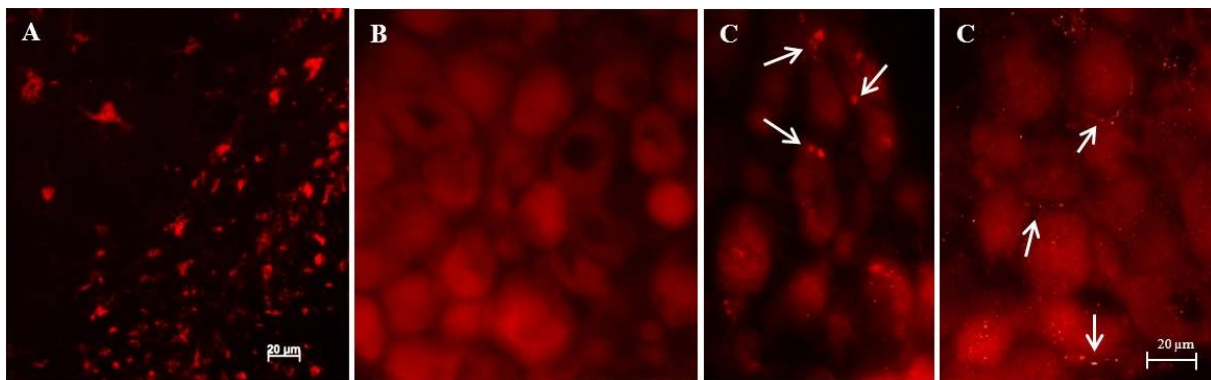


Abbildung 25 Test von CD68 (Wirt: Ratte; Abcam und Wirt: Kaninchen; Abcam) Antikörpern auf Milz und DRG-Kryoschnitten der Maus.

25A Beide Antikörper detektieren Makrophagen in der Milz. Dargestellt ist die Markierung mit CD68 (Wirt: Kaninchen) **25B** Die Markierung von DRGs gesunder Mäuse mit CD68 (Wirt: Ratte; Abcam) zeigte nur CD68-positive Neurone **25C** Der CD68 (Wirt: Kaninchen) Antikörper markierte auch DRG-Neurone gesunder Mäuse, aber ließ noch weitere kleine Zellen neben den Neuronen vermuten.

3.5.2 CD11a, CD11b und F4/80 Markierungen im DRG der Maus

Alternativ zu CD68 wurden die Leukozytenmarker CD11a und CD11b zur Makrophagen-identifizierung in der Maus getestet. Abb. 26 zeigt eine starke neuronale Anfärbung der DRGs gesunder und AIA-erkrankter Mäuse mit CD11a (Cy3 = rot; Abb. 26A/26B) und eine Markierung in den DRGs gesunder Mäuse mit den CD11b-Antikörper (Cy2 = grün; Abb. 26C). F4/80 wurde bei der Durchflusszytometer-Analyse (Abb. 7) zur erfolgreichen Anfärbung von BMDM (v.a. M1-Makrophagen) genutzt. Im DRG der Maus angewendet, zeigte F4/80 auch eine starke neuronale Markierung.

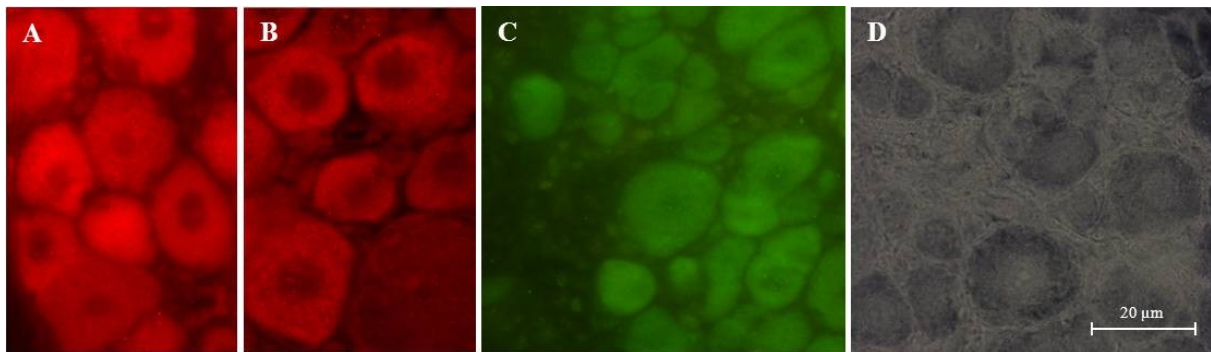


Abbildung 26 Markierung von DRG-Neuronen (Maus) mit den Immunzellmarkern gegen CD11a, CD11b und F4/80

26A/26B DRG-Neurone gesunder und AIA-induzierter Mäuse zeigten eine positive CD11a (Cy 3 = rot) Anfärbung. **26C/26D** CD11b (Cy2= grün) und F4/80 (Biotin, schwarz) wurden auch in DRGs gesunder Mäuse detektiert.

3.5.3 Anfärbung von DRG-Neuronen mit „T-Zell spezifischen“ Antikörpern

Da es im Laufe der AIA zu einer Einwanderung von Makrophagen in die lumbalen DRGs kommt, lag die Vermutung nahe, dass auch andere Immunzellen wie T-Lymphozyten neuronales Gewebe infiltrieren und möglicherweise im Verbund mit Makrophagen die AIA beeinflussen könnten. Zur Detektion von T-Zellen im DRG wurden Antikörper gegen CD3, T-cell receptor (TCR)- α und TCR- $\alpha\beta$ genutzt. Der Test des CD3-Antikörpers auf Milzgewebe der Ratte zeigte, dass der Antikörper Immunzellen, wahrscheinlich T-Lymphozyten, erkennt (Abb. 27A). Überraschenderweise markierte er zudem Neurone in Zellkultur (Abb. 27B) und in DRG-Schnitten gesunder (Abb. 27C) und AIA-erkrankter (3 Tage: Abb. 27D) Ratten. Ein ähnliches Resultat ergab die Anfärbung von DRG-Schnitten gesunder Mäuse mit TCR- α und TCR- $\alpha\beta$ (Abb. 27E/27F).

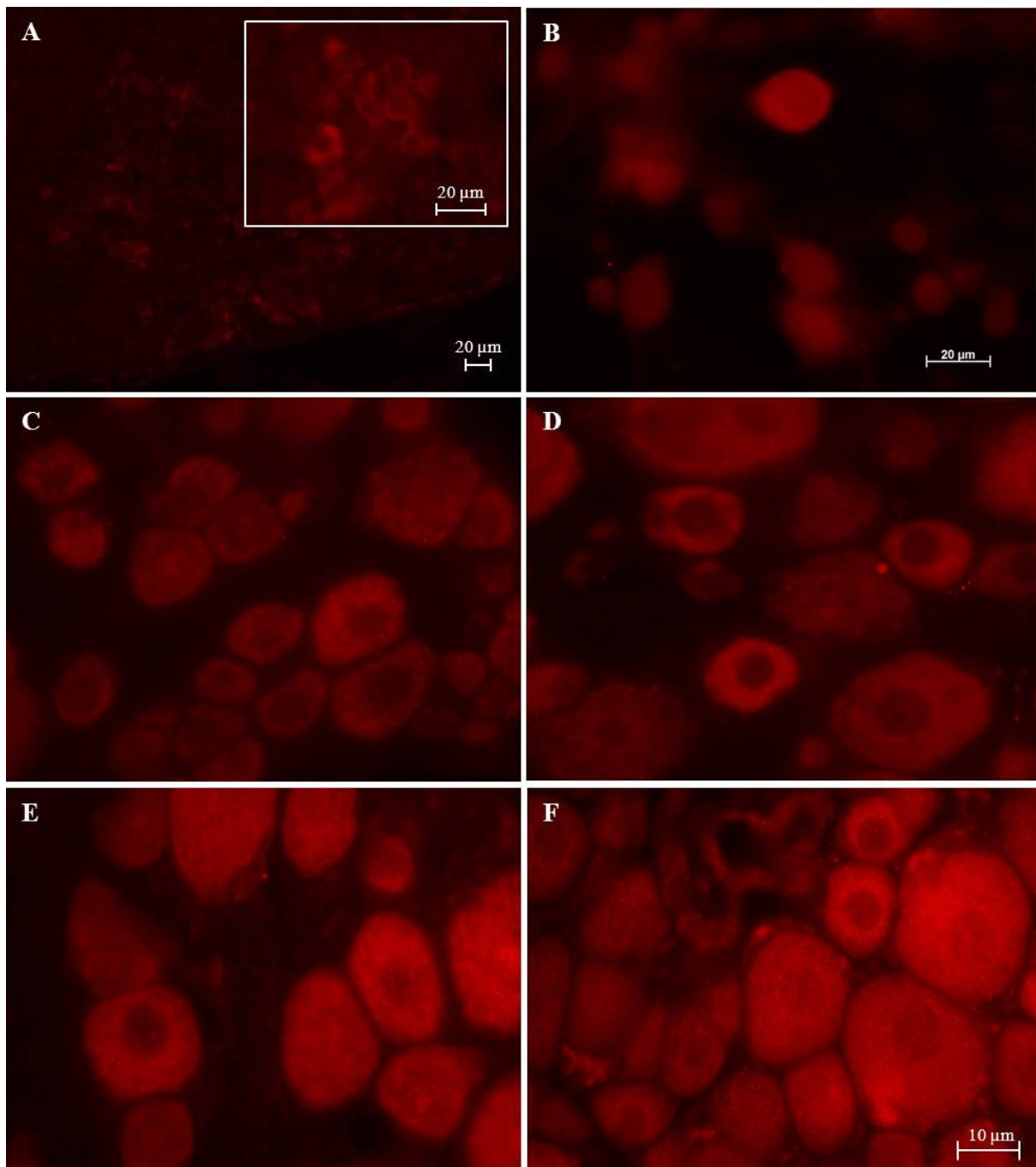


Abbildung 27 Test von T-Zell spezifischen Antikörpern im DRG der Ratte.

27A Positive Markierung der Milz mit dem CD3 (Cy3) Antikörper **20B** Dennoch werden auch DRG-Neurone in Kultur, **27C** in DRG-Schnitten gesunder Ratten und **27D** von AIA-erkrankten Ratten (3 Tage) über anti-CD3 markiert. **27E/27F** Test der Antikörper gegen TCR- α (Cy3) oder TCR- $\alpha\beta$ (Alexa 568 = rot) im DRG gesunder Ratten zeigt eine ähnliche Markierung neuronaler Zellen.

Ein weiteres Indiz, dass Neurone Immunzellmarker exprimieren könnten, gibt der Western Blot mit dem CD3-Antikörper in Abb. 28. Die Markierung von β -Aktin (40 kDa) dient zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Proben. In den DRG-Proben gesunder und AIA-erkrankter Mäuse (1/ 3/ 21 Tage; Proben 2 bis 5) ist ein 23 kDa-großes Protein nachweisbar.

Die 23 kDa-Bande, die der Größe von CD3 entspricht, ist zudem sehr deutlich in der Milz (= Positivkontrolle; Probe 6 und 8) zu sehen. In der Probe von Makrophagen-Monokulturen (Probe 7) ist eine verhältnismäßig dünne CD3-Bande im Vergleich zur dicken β -Aktin-Bande erkennbar. In der Probe von kultivierten DRG-Neuronen zeigt die β -Aktin-Markierung eine sehr geringe Proteinbeladung an. Dennoch ist auch in diesen Proben eine Bande in der Größe von CD3 markiert. Somit ist in neuronalen Zelllysaten wie auch in DRG-Lysaten ein Protein in der Größe von CD3 erkennbar unabhängig von der Induktion einer AIA. Die CD3-Markierung in Milzlysaten signalisiert, dass der CD3-Antikörper funktionsfähig war.

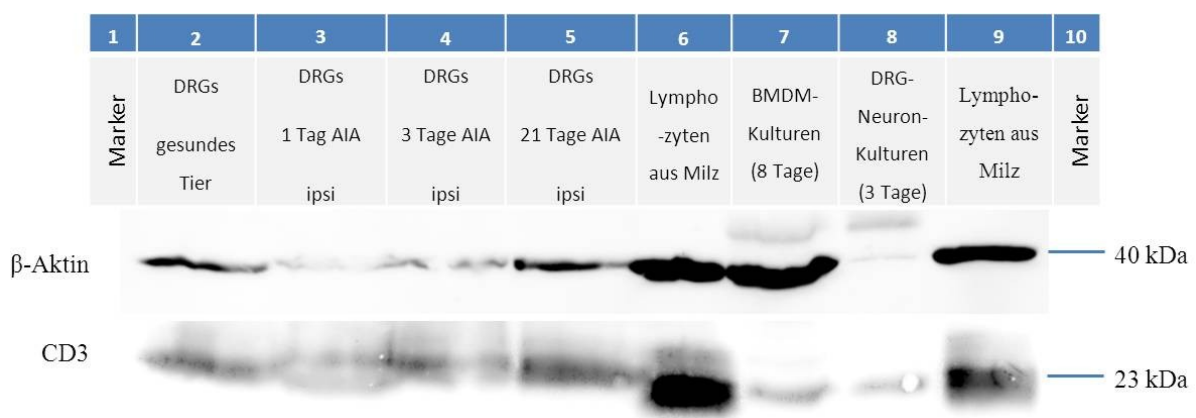


Abbildung 28 Western Blot mit CD3 und β -Aktin

Die β -Aktin-Markierung (40 kDa) zeigt, dass in allen Proben Protein vorhanden war. CD3 (23 kDa) wurde in DRGs gesunder Mäuse und AIA-erkrankter Mäuse (Tag1, 3 und 21) markiert. CD3 war in verschiedener Intensität zudem in Milzlysaten, BMDM-Kulturen und DRG-Neuronenkulturen detektierbar.

Es wurden histologische Markierungen von DRG-Neuronen mit T-Zellmarkern (CD3; TCR- α ; TCR- $\alpha\beta$), Makrophagenmarkern (CD68; F4/80) und auch mit dem Leukozytenmarker CD11a gezeigt. Als Positivkontrolle für die Spezifität der Antikörper wurden CD68 und CD3 erfolgreich für eine Markierung von Makrophagen und T-Zellen in Milzschnitten getestet. CD68- und CD3-Antikörper färbten zudem auch DRG-Neurone in Kultur an. Sogar im Western Blot konnte mit anti-CD3 eine Markierung in DRG-Lysaten wie auch Milzlysaten gezeigt werden. Somit gibt es Hinweise, dass DRG-Neurone Immunzellmarker exprimieren.

4. Diskussion

4.1 Methodische Betrachtungen zur Monokultivierung

4.1.1 BMDM-Monokulturen

Die durchflusszytometrischen und immunhistochemischen Daten zeigten, dass unter dem Einfluss von M-CSF mindestens 80% der isolierten Knochenmarkszellen in Makrophagen differenziert werden konnten. Weil es keinen Marker gibt, der für Makrophagen gänzlich spezifisch ist, wurde eine Kombination der 3 Marker CD11b, F4/80 und CD68 gewählt. CD11b, ein Integrin mit wichtiger Funktion bei der Zelladhäsion, ist auf der Oberfläche aller Makrophagentypen exprimiert, aber auch auf anderen Leukozyten (Huu, 1993). Als ein Komplementrezeptor ist CD11b zudem verantwortlich für die Erkennung und Phagozytose von Mikroorganismen (Gbarah et al., 1991). CD68, ein lysosomales und schwach Oberflächen-exprimiertes Protein, wurde als der spezifischste Makrophagen-/Monozyten-Marker betrachtet, aber auch andere myeloide Zellen wie Osteoklasten und dendritische Zellen und zudem Fibroblasten sind CD68-positiv (Kunz-Schughart et al., 2003). Die Funktion von CD68 ist nicht geklärt, aber eine Studie an Osteoklasten zeigte eine Beteiligung im Vesikeltransport und bei der Phagozytose (Ashley et al., 2011). Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit noch eine CD68-Markierung muriner DRG-Neurone *in vitro* und *in vivo* sowie von Motoneuronen des Rückenmarks detektiert. Eine mögliche Bedeutung der neuronalen CD68-Markierung wird unter 4.5 diskutiert. F4/80 wird auf Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Allerdings ist das Ausmaß der Expression von F4/80 von dem Aktivitätsstadium der Makrophagen abhängig (Vereyken et al., 2011). Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine geringere Expression von F4/80 in ruhenden Makrophagen als nach Stimulation mit IL-4, TNF- α und besonders mit LPS/IFN- γ .

Eine relativ homogene Morphologie, das adhäsive Verhalten und das Zytokin- und NO-Profil der *in vitro*-generierten Zellen unterstützen die Annahme, dass es sich bei den gewonnenen Zellen zum Großteil um Makrophagen handelte. Dennoch ist zu erwarten, dass jede BMDM-Kultur einige Kontaminationen mit Makrophagen-ähnlichen myeloiden dendritischen Zellen enthält, da diese morphologisch und über Oberflächenmarker schwer von Makrophagen zu unterscheiden sind. Zudem erkennt man in den Kulturen einige Fibroblasten, die durch eine flache und lang gestreckte Morphologie gekennzeichnet sind. Eine Alternative ohne

Kontaminationen anderer Zelltypen wären Tumorzelllinien, die aber keine Zellzykluskontrolle mehr besitzen und sich nicht physiologisch verhalten.

4.1.2 DRG-Monokulturen

Es gibt keine Tumorzelllinie, die normalen DRG-Neuronen entspricht, sodass DRG-Neurone nur in primären Kulturen untersucht werden können. DRG-Neurone werden bei der Präparation grundsätzlich axotomiert und somit verletzt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind 1 Tag nach der Präparation 92% der DRG-Neurone ATF3-positiv, und dies war nicht signifikant verändert bis zum Tag 4 (Abb. 11B). ATF3 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle bei der Axonregeneration und dem Überleben von Neuronen spielt. Er wird als ein anerkannter Marker für die Identifizierung neuronaler Schädigungen genutzt (Tsujino et al., 2000; Seijffers et al., 2007). Obwohl DRG-Neurone bei der Präparation geschädigt werden, erholen sie sich soweit, dass sie vital sind und neue Ausläufer bilden. Sie können als funktionsfähige Neurone für Patch Clamp-Ableitungen und Calcium Imaging-Analysen genutzt werden. In DRG-Kulturen sind grundsätzlich neben Neuronen Satellitenzellen vorhanden, und es wird angenommen, dass diese wichtig für das Überleben und die Funktionalität der Neurone sind. In einer Arbeit von Tang et al. (2007) wurde gezeigt, dass gereinigte Neuronen-Kulturen ohne nicht-neuronale Zellen eine geringere Aktivität aufwiesen, gemessen an einer verringerten Freisetzung von Substanz P.

4.2 Methodische Aspekte der Kokultivierung

Die Kokultur eröffnet die Möglichkeit, in einem reduktionistischen Ansatz die Wechselwirkung von DRG-Zellen und Makrophagen unter Modulation des Aktivierungsstatus der BMDM und Veränderung des Abstandes zwischen den Zellen zu untersuchen. Daher eignet sie sich, um zelluläre Interaktionen zu studieren, die in vivo bei peripheren neuropathischen und neuroinflammatorischen Erkrankungen wie z.B. Diabetes-vermittelte Neuropathie, Ligation des Ischiasnerves, Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis vorkommen.

Während in indirekter Kokultur BMDM und Neurone schon deshalb leicht voneinander unterscheidbar sind, da sie auf verschiedenen Glasplättchen kultiviert werden, ist die Unterscheidung der Zellen in direkter Kokultur auf den ersten Blick nicht trivial. Jedoch

waren auch in direkter Kokultur Neurone durch ihre Größe, runde Form und Axone von den meist kleineren und polymorphen BMDM mit kurzen Pseudopodien zu unterscheiden. Betrachtet man die Größenverteilung der Neurone (8 – 26 μm) in Kultur, dann fällt auf, dass Makrophagen mit ca. 12 μm Durchmesser in der Dimension kleiner Neurone liegen. Deshalb wurden Neurone zur eindeutigen Identifizierung in Zellkultur mit einem Antikörper gegen Peripherin, einem neuronalen Intermediärfilament, markiert, das von allen Neuronen des peripheren Nervensystems exprimiert wird. Peripherin hat eine wichtige Funktion bei dem Auswuchs von Axonen während der Entwicklung und der Regeneration (Lariviere et al., 2002).

Die Vitalität und Funktionalität von BMDM und DRG-Neuronen in Kokultur wurde im Calcium Imaging gezeigt. Fast alle BMDM und eine Subgruppe von DRG-Neuronen antworteten auf die Zugabe von ATP mit einer schnellen intrazellulären Calciumerhöhung. Makrophagen exprimieren die Ionenkanaltypen P2X7R und P2X4R, die sehr permeabel für Calcium sind (Ulmann et al., 2010), und eine genetische Deletion von P2X7R verhindert den ATP-vermittelten Calciumeinstrom in murine Makrophagen (Pelegriin and Surprenant, 2009). Die Antwort einiger Neurone auf ATP wurde bereits in der Literatur beschrieben. Der ionotrope purinerge Rezeptor P2X3 wird in 35% der DRG-Neurone exprimiert (Bradbury et al., 1998), wobei nur Capsaicin-sensitive, kleine und mittelgroße Neurone P2X3 exprimieren und auf ATP reagieren (Ueno et al., 1999). Andererseits bewirkte die Zugabe von KCl nur in Neuronen eine Calciumerhöhung durch Depolarisations-vermittelte Öffnung von Spannungs-abhängigen Calciumkanälen (Corrales et al., 2005). Makrophagen zeigten eher eine geringe, aber stabil reproduzierbare Abnahme des intrazellulären Calciums nach KCl-Zugabe. Zusammengefasst, kann die Stimulation mit ATP und KCl im Calcium Imaging aufgrund des typischen Antwortmusters dazu genutzt werden, um zwischen vitalen BMDM und DRG-Neuronen in direkter Kokultur zu unterscheiden.

4.3 Interaktionen von BMDM und DRG-Neuronen in Kokultur

4.3.1 Beeinflussung der neuronalen Vitalität in Kokultur

Es ist aus Untersuchungen an Neuropathie-Modellen bekannt, dass Makrophagen auf verschiedene Weise die Vitalität der Neurone beeinflussen können. Am Modell der Ligation des Ischiasnerves wurde eine Infiltration von gewebeschädigenden M1-Makrophagen beobachtet (Komori et al. (2011)). Es wurde gezeigt, dass diese Makrophagen die Wallersche

Degeneration förderten. Ein weiteres Beispiel dafür, dass Makrophagen neurotoxisch wirken können, wird in einer Arbeit von Horn et al. (2008) gezeigt. Dabei erhöhte die Depletion von Makrophagen nach Verletzung des Rückenmarks der Ratte den Auswuchs der Axone. Auf der anderen Seite haben Makrophagen das Potential neuroregenerativ zu wirken, wie an dem Beispiel von Myelin-stimulierten Makrophagen gezeigt wurde, die durch die Produktion neurotropher Faktoren das neuronale Überleben und den axonalen Auswuchs förderten (Hikawa and Takenaka, 1996). Die neuroregenerative oder neurotoxische Wirkung von Makrophagen hat einen zentralen Einfluss auf die Pathogenese zahlreicher Krankheiten. Bei der AIA war der Aktivitätszustand der Makrophagen im DRG noch nicht bekannt. Allerdings waren in den DRGs von AIA-induzierten Ratten trotz Makrophageneinwanderung keine Anzeichen für neuronale Schädigung zu identifizieren (Segond von Banchet, 2009). Daher nutzten wir die Kokultur, um verschiedene Szenarien der Stimulation und Interaktion von Makrophagen und DRG-Neuronen zu testen, um dann Rückschlüsse, im speziellen, auf den Makrophagentyp im DRG bei der AIA ziehen zu können.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nur LPS/IFN- γ -stimulierte Makrophagen signifikant die neuronale Mortalitätsrate erhöhten, wohingegen ruhende bzw. TNF- α - und IL-4-stimulierte Makrophagen den Anteil toter Neurone reduzierten. Die Untersuchungen zeigten, dass vor allem die NO-Freisetzung von BMDM für die Schädigung der Neurone nach LPS/IFN- γ -Stimulation in Kokultur verantwortlich war. Erstens, in direkter Kokultur bestand eine eindeutige Abhängigkeit zwischen neuronaler Mortalitätsrate und der Menge des freigesetzten NOs. Zweitens, die Hemmung der iNOS in direkter Kokultur reduzierte signifikant die Rate toter Neurone. Drittens, nur BMDM waren die Quelle von NO, da nur in Monokultur-Überständen von BMDM, aber nicht in Neuronen-Überständen Nitrat detektiert werden konnte, auch wenn prinzipiell Neurone und Makrophagen NOS exprimieren können. Es ist bekannt, dass Neurone vor allem kleine Mengen von NO freisetzen und zur neuronalen Kommunikation nutzen können (Yakovleva et al., 2013). Makrophagen produzieren hingegen große Mengen NO um nach klassischer Aktivierung Pathogene abzuwehren (Janeway et. al, 2002). Eine Schädigung der Neurone nach LPS/IFN- γ -Stimulation wurde allerdings nur in direkter, aber nicht in indirekter Kokultur gefunden. Dies passt zu der Annahme, das NO nur über kurze Strecken wirksam ist bevor es dissoziiert. Die signifikante Verringerung toter Neurone in direkter Kokultur mit ruhenden bzw. TNF- α - und IL-4-stimulierten BMDM könnte die Folge einer Phagozytose geschädigter Neurone durch BMDM sein, wie es in der Literatur von apoptotischen Neuronen des Cerebellums und Mikrogliazellen beschrieben wurde (Witting et al., 2000). Andererseits ist es möglich, dass Makrophagen proregenerativ

auf Neurone wirken. In einer klinischen Studie an Patienten mit Rückenmarksverletzungen wurde demonstriert, dass die Injektion von M2-Makrophagen ins Rückenmark bei ca. 40% der Patienten die sensorischen Funktionen signifikant verbesserten (Knoller et al., 2005). Ein proregenerativer Kandidat könnte in der Kokultur das Makrophagenprodukt IL-6 sein. Es wurde gezeigt, dass IL-6 (mit sIL-6R) das Auswachsen von Axonen des peripheren Nervensystems förderte (Schafer et al., 1999; Wu et al., 2007). Der Mechanismus bzw. die möglichen proregenerativen Mediatoren in unserem Modell wurden nicht detaillierter untersucht.

In einer Arbeit von Gensel et al. (2009) wurde die duale Wirkung der Makrophagen auf das Überleben von Neuronen des Rückenmarks und der DRGs *in vivo* näher untersucht. Auch in ihrem Modell, in dem Makrophagen im Rückenmark der Ratte durch Zymosan aktiviert wurden, war die Wirkung der Makrophagen auf die Neurone abhängig von dem Abstand zwischen beiden Zelltypen. Wenn Makrophagen entfernt von den verletzten Neuronen aktiviert wurden, wuchsen die Axone verletzter Neurone vermehrt aus. Bei einer Makrophagenaktivierung in unmittelbarer Nähe zu den axotomierten Neuronen kam es zu einem Rückzug der Axone. Dieses zeigt, dass der Aktivierungszustand sowie die Entfernung der Makrophagen zu den Neuronen im *in vitro* Modell wie auch *in vivo* von Bedeutung sind für den Effekt, den sie auf die neuronale Vitalität ausüben.

4.3.2 Beeinflussung der neuronalen Aktivität in Kokultur

CGRP ist ein Neuropeptid, das von aktivierten DRG-Neuronen freigesetzt wird und wichtige Aufgaben bei der Induktion der neurogenen Entzündung (Kilo et al., 1997), der Vasodilatation und der Sensibilisierung von Neuronen besitzt (Bird et al., 2006). Da die Freisetzung von CGRP aus kultivierten DRG-Neuronen verlässlich messbar ist, eignet sich die CGRP-Konzentration im Medium als Ausgabeparameter für neuronale Aktivierung. Die Stimulation direkter Kokulturen mit LPS/IFN- γ für 5 und 20 min erhöhte signifikant die Freisetzung von CGRP. Makrophagen können unter den experimentellen Bedingungen als CGRP-Quelle ausgeschlossen werden, da in Überständen von LPS/IFN- γ stimulierten BMDM-Monokulturen kein CGRP messbar war. Die Stimulation von Neuronen-Monokulturen mit LPS/IFN- γ bewirkte keine signifikante Erhöhung der CGRP-Konzentration. Somit bestand eine zentrale Frage darin, über welche Mediatoren Makrophagen diesen Effekt auf Neurone ausübten. Makrophagen können eine Reihe von Mediatoren produzieren, die das Potential besitzen die neuronale CGRP-Freisetzung zu

induzieren, z.B. die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β (Hou et al., 2003), IL-6 und TNF- α (Opree and Kress, 2000). Allerdings zeigte die Messung der freigesetzten Zytokine (siehe Ergebnisteil; Abb. 9), dass in Makrophagen-Kulturen, die weniger als 1 Stunde stimuliert wurden noch keine nachweisbaren Konzentrationen dieser Zytokine vorkamen. Auch das von Makrophagen produzierte NO könnte die Freisetzung von CGRP induzieren. NO war zwar nach 1-stündiger Stimulation nicht in Makrophagen-Überständen nachweisbar, aber es ist bekannt, dass NO auch in sehr geringen Konzentrationen wirksam sein kann. Die Applikation des iNOS-Inhibitors Aminoguanidine Hydrochlorid zu direkten LPS/IFN- γ -stimulierten Kokulturen hatte allerdings keine Wirkung auf die CGRP-Produktion, sodass auch NO als Mediator ausgeschlossen werden konnte. Es wurde zudem berichtet, dass die Zugabe der Chemokine CCL2 und CXCL1 zu DRG-Kulturen die Freisetzung von CGRP induzierte (Qin et al., 2005). Allerdings wirken diese erst nach mehrstündiger Inkubation und können somit ebenfalls ausgeschlossen werden. Demgegenüber wurde in einer Studie von Averbek et al. (2000) gezeigt, dass Prostaglandine und ein saurer pH-Wert von 6,1 die CGRP-Freisetzung nach wenigen Minuten induzierte. Es ist bekannt, dass Makrophagen beim oxidativen Burst Protonen sehr schnell abgeben (Murphy and Forman, 1993), und auch eine Freisetzung von Prostaglandinen aus Makrophagen wurde berichtet (Shibata, 1995). Ein zukünftiges Ziel wird es sein, den Mediator zu identifizieren, der die neuronale CGRP-Freisetzung in LPS/IFN- γ -stimulierten Kokulturen vermittelt. Prostaglandine und Protonen sind die beiden verdächtigsten Mediatoren für die Vermittlung schneller Effekte.

4.3.3 Charakteristische Zytokinproduktion von BMDM in Monokultur und in Kokultur

Makrophagen produzieren abhängig von den auf sie einwirkenden Umgebungsstimuli verschiedene Mediatoren. Über die Analyse dieser Mediatoren können sie als Makrophagen identifiziert werden und die spezifischen Makrophagentypen unterschieden werden. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die LPS/IFN- γ -Stimulation (24 Stunden) von BMDM in Monokultur zur für M1-Makrophagen charakteristischen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β , sowie zur Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 und des zytotoxischen Produkts NO führt. Und auch die TNF- α -stimulierten M1-Makrophagen sezernierten im *in vitro* Modell, im Unterschied zu ruhenden Makrophagen, die für sie charakteristischen proinflammatorischen Zytokine, aber kein NO. Als Drittes untermauerte die alternative Stimulation der BMDM-Monokulturen mit IL-4, dass

die in dieser Arbeit genutzten Makrophagen funktionsfähig und in ihrer Aktivität modifizierbar sind.

Neurone produzieren einige Mediatoren wie z.B. CGRP und Substanz P, die potentiell die Zytokin- und NO-Produktion von Makrophagen modulieren könnten. So beschreibt eine Arbeit von Cuesta et al. (2002), dass neuronales CGRP und Substanz P stimulierend auf die Freisetzung von IL-6, TNF- α und IL-1 β auf kultivierte humane Lymphozyten wirkten. CGRP übte eine gegenteilige Wirkung auf LPS-stimulierte peritoneale Makrophagen aus, bei ihnen inhibierte die CGRP-Zugabe die Freisetzung von TNF- α (Gomes et al., 2005). In dem in dieser Arbeit untersuchten Modell, der LPS/IFN- γ -stimulierten direkten und indirekten Kokulturen wurde nach 24 Stunden trotz nachweisbarer Freisetzung von CGRP über Neurone keine Modulation der Zytokin- und NO-Produktion der Makrophagen beobachtet. In dieser Arbeit konnte somit weder Indizien für eine pro- noch für eine antiinflammatorische Wirkung von neuronalen Mediatoren gesammelt werden.

4.3.4 Beeinflussung der Proliferationsrate von BMDM in Kokultur

In einem Proliferationsassay wurde untersucht, ob Neurone auch einen Einfluss auf Makrophagen ausüben können. Bisher gab es vor allem Indizien dafür, dass die Erhöhung der Makrophagenanzahl in den DRGs in der akuten Phase der AIA von Maus und Ratte auf eine Immigration über die Blutgefäße zurückzuführen wäre. In einer Studie von Segond von Banchet (2009) wurde gezeigt, dass es Akkumulationen von ED1-positiven Zellen an den Blutgefäßen der Ratte gab. Die Hemmung der TNF- α -Wirkung durch eine Injektion von Etanercept verringerte die Anzahl der Makrophagen im DRG signifikant und parallel dazu auch die Expression von VCAM-1, das eine wichtige Funktion bei der Einwanderung von Immunzellen ins Gewebe spielt. Dennoch sollte untersucht werden, ob DRG-Neurone zudem die Anzahl der Makrophagen durch Regulation ihrer Proliferation beeinflussen können. Nur im direkten Kontakt kultiviert, erhöhten DRG-Neurone signifikant die Proliferationsrate von ruhenden BMDM. Dieser Effekt war nicht zu beobachten in Randbereichen der direkten Kokultur in denen nur Makrophagen wuchsen bzw. in indirekten Kokulturen, was die Vermutung nahe legte, dass der proliferationsfördernde Effekt über direkte Zellkontakte bzw. über sehr kurzlebige Mediatoren vermittelt wurde. Um die Bedeutung von neuronalem membran-gebundenem TNF- α für die Proliferationsrate zu testen, wurden Etanercept, der TNF Rezeptor1-Antagonist (TNFR1-A) und der TNFR2-A getestet. Etanercept bindet und blockiert TNF- α über seine TNFR2-Bindungseinheit. Die Blockade des TNFR2 über seinen

Rezeptorantagonisten und die Applikation von Etanercept hatten keine Wirkung auf die Proliferationsrate der BMDM, aber die Zugabe des TNFR1-A verringerte den Anteil proliferierender BMDM signifikant, allerdings nicht auf das Niveau von Makrophagen-Monokulturen. In einem Bericht von Guilbert et al. (1993) wurde gezeigt, dass TNF- α die Proliferationsrate von Makrophagen modulieren konnte, aber nur in Kombination mit M-CSF. In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass die Zugabe von M-CSF zu Makrophagen-Monokulturen die Proliferation förderte. Die Inkubation von Makrophagen-Monokulturen mit TNF- α allein hatte keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. DRG-Neurone können M-CSF produzieren (Takeuchi et al., 2001), sodass die Vermutung nahe liegt, dass der proliferationssteigernde Effekt in direkten Kokulturen über einen synergistischen Effekt von neuronalen membran-gebundenen TNF- α und zum Beispiel neuronal sezernierten M-CSF vermittelt wurde. Bezogen auf das Szenario in den DRGs in der akuten Phase der AIA könnten diese Ergebnisse bedeuten, dass neuronales TNF- α nicht nur die Einwanderung der Makrophagen, sondern auch deren Vermehrung stimulieren könnte. In weiterführenden Arbeiten sollte eine eventuelle Produktion von M-CSF über Neurone in direkter Kokultur eruiert werden und dessen Rolle bei der BMDM-Proliferation untersucht werden.

In einem weiteren Proliferationsassay wurden DRG-Neurone in Kokultur mit Capsaicin oder KCl stimuliert. Capsaicin stimuliert Neurone über den TRPV1-Rezeptor, einen unselektiven Kationenkanal (Oh et al., 1996; Rosenbaum et al., 2004). Capsaicin und KCl bewirken einen Einstrom von Kationen in Neurone und evozieren, durch die dadurch ausgelöste Depolarisation, die Ausschüttung von Mediatoren, wie z.B. CGRP oder Substanz P (Tang et al., 2007). Capsaicin hatte weder in Monokultur noch in Kokultur einen Einfluss auf die Proliferationsrate von BMDM. Im Unterschied dazu, übte KCl bereits auf Makrophagen in Monokultur einen signifikanten Proliferations-hemmenden Effekt aus. Makrophagen besitzen eine Reihe von Kaliumkanälen (Vicente et al., 2005), sodass der Einstrom von Kalium in die Zelle zu einer Depolarisation der Makrophagen führen kann. Eine Untersuchung an Schwann-Zellen zeigte, dass es bei der Proliferation zu einer Hyperpolarisation der Zelle kommt. Folglich scheint KCl der, für die Proliferation wichtigen, Hyperpolarisation der Zelle entgegen zu wirken (Chiu and Wilson, 1989). Somit ist KCl nicht dafür geeignet, die Beeinflussung der Proliferationsrate von BMDM über DRG-Neurone zu untersuchen. Capsaicin aktivierte zwar selektiv Neurone, aber nicht auf eine Weise, die Makrophagen zur Proliferation stimulierte.

4.4 Einwanderung von nicht aggressiven, potentiell pronozizeptiven Makrophagen in die DRGs der Ratte in der akuten Phase der AIA

Eine Infiltration von Makrophagen in das verletzte oder entzündete Gewebe wurde bei einer Reihe von neuropathischen Krankheiten beschrieben, wie z.B. der neuralen Muskelatrophie (Groh et al., 2010) oder der diabetischen Neuropathie (Conti et al., 2002). In einer Arbeit von Segond von Banchet et al. (2009) wurde zudem für die AIA in der Ratte gezeigt, dass 3 Tage nach Induktion der AIA in einem der beiden Kniegelenke ED1-positive Makrophagen in die innervierenden DRGs der entzündeten Bereiche und kontralateral, in die DRGs der nicht entzündeten Seite, immigrierten. ED1 ist ein etablierter Marker für Makrophagen in der Ratte. Die vorliegende Arbeit belegt zudem, dass bereits 1 Tag nach AIA-Auslösung und auch noch am Tag 7 der Entzündung ED1-positive Makrophagen die DRG-Neurone der Ratte umgeben. In der Maus wurde hingegen der Makrophagen- und Mikroglia marker Iba1 zur Identifizierung von Makrophagen am Tag 7 der AIA im DRG genutzt. Es scheint, als ob bei der Maus die Makrophageneinwanderung langsamer verläuft als bei der Ratte. Alle weiteren Analysen zur Charakterisierung des DRG-immigrierten Makrophagentypes wurden aus methodischen Gründen an der Ratte durchgeführt. Die Anfärbung mit Iba1 zeigte wesentlich mehr Hintergrundanfärbung der Maus-Neurone als ED1 bei der Ratte. Die Expression von Arg1, iNOS, COX-2 und IL-6 *in vitro* waren bei Makrophagen der Ratte und Maus gleich, sodass die Ergebnisse der Makrophagen-Charakterisierung im DRG der Ratte vermutlich auf Maus-Makrophagen übertragbar sind. Um zu untersuchen, ob die Makrophagen im DRG der Ratte potentiell gewebeschädigend waren, wurde die Expression von Arg1 und iNOS analysiert. Die Enzyme Arg1 und iNOS konkurrieren beide um das Substrat Arginin (Tenu et al., 1999). Bei einer Aktivierung von iNOS, wie im Fall von mit LPS/IFN- γ -stimulierter Makrophagen, kommt es zur Freisetzung von gewebeschädigendem NO, das wichtig für die Abwehr von Pathogenen ist. Die Arg1 hingegen katalysiert den Abbau von Arginin zu Ornithin und Harnstoff, welche keine zytotoxischen Effekte aufweisen, wie am Beispiel von mit IL-4- und TNF- α -stimulierten Makrophagen *in vitro* demonstriert wurde. Antikörpermarkierungen zeigten, dass DRG-immigrierte Makrophagen Arg1 an Stelle von iNOS exprimierten. Dies passt zu dem Resultat, dass im AIA-Modell DRG-Neurone negativ für ATF3 waren, ein Indiz, dass sie keine Schädigung aufwiesen (von Banchet et al., 2009). Im Vergleich wurde in neuropathischen Modellen, wie z.B. bei der Durchtrennung des Ischiasnervens, eine ATF3-Induktion der DRG-Neurone detektiert (Linda et al., 2011). Im gleichen Neuropathie-Modell wurde zudem eine Invasion von iNOS-positiven M1-Makrophagen beschrieben (de la Hoz et al., 2003). Im AIA-Modell wurde beobachtet, dass die Immigration der Makrophagen mit

einer Entstehung von mechanischer und thermischer Hyperalgesie korrelierte. Obwohl die Entzündung nur in einem Knie induziert wurde, erfolgte die Makrophagen-Einwanderung interessanterweise bilateral, und parallel dazu entwickelte sich in beiden Knien eine Hyperalgesie (Segond von Banchet; 2009). Um zu untersuchen, ob Makrophagen im DRG pronozizeptiv wirken könnten, wurden die Marker COX-2 und IL-6 untersucht. COX-2 katalysiert die Freisetzung von Prostaglandinen, von denen gezeigt wurde, dass sie zur Sensibilisierung von Neuronen beitragen (Southall and Vasko, 2000). Unter Zellkulturbedingungen exprimierten IL-4-, TNF- α - und vor allem LPS/IFN- γ -stimulierte Makrophagen COX-2. Im DRG der Ratte konnte keine COX-2-Markierung der Makrophagen detektiert werden. Hingegen waren die DRG-immigrierte Makrophagen IL-6-positiv. Neurone exprimieren konstitutiv gp130, eine Untereinheit des IL-6 Rezeptors und können somit potentiell über IL-6 aktiviert werden. Manjavachi et al. (2010) zeigten, dass in einem Maus-Modell die Zugabe von IL-6 eine Induktion der muskulären Hyperalgesie bewirkte. In einem eigenen Versuch vermittelte die Zugabe von IL-6/sIL-6R mit KCl eine Aktivierung der Neurone in Monokultur, gemessen an der Freisetzung von CGRP. Die Expression von IL-6 in DRG-immigrierten Makrophagen ist ein erster Hinweis, dass und auf welche Weise Makrophagen während der AIA zur Entstehung der Hyperalgesie beitragen könnten.

4.5 Neuronale Anfärbung mit Immunmarkern: Echt oder ein Artefakt?

Die hier beobachtete Markierung von Neuronen in der Maus durch die Immunmarker anti-CD68, anti-F4/80, anti-CD11a und anti-CD3 eröffnete die Frage, wie spezifisch diese Markierungen einzuschätzen sind. CD68 wird häufig als Makrophagenmarker genutzt, aber Kunz-Schughart et al. (2003) zeigte zudem eine Anfärbung von dendritischen Zellen, Osteoklasten und Fibroblasten. In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren eine CD68-Markierung von DRG-Neuronen mit drei Antikörpern verschiedener Hersteller detektiert. Zwei dieser CD68-Antikörper wurden vorher erfolgreich auf Milzschnitten und auf Makrophagen-Zellkulturen getestet und somit konnte demonstriert werden, dass sie tatsächlich Makrophagen markierten. Einer der CD68-Antikörper wurde zudem im Rückenmark der Maus getestet und zeigte dort eine positive Markierung der Motoneurone. Somit gibt es einige Indizien, dass CD68 nicht nur eine wichtige Rolle in Immunzellen spielen könnte, sondern auch bei weiteren Zellen, wie die CD68-Markierung der Neurone andeutet.

CD3 besteht aus vier Polypeptidketten (2x ϵ ; 1x δ ; 1x γ) und stellt gemeinsam mit einer ζ -Kette und den beiden Ketten des T-Zell-Rezeptors (1x α ; 1x β) den T-Zell-Rezeptor-Komplex dar. Es wurde lange davon ausgegangen, dass die Expression der verschiedenen Untereinheiten des T-Zell-Rezeptor-Komplexes für T-Zellen spezifisch sei (Janeway et al., 2002). In einer Arbeit von Nakamura et al. (2007) wurde hingegen eine Expression der CD3 ϵ -Kette in den Purkinje Neuronen des Cerebellums gezeigt. Mittels CD3 ϵ -defizienten Mäusen wurde eine wichtige Rolle von CD3 ϵ während der Entwicklung der Purkinje-Neurone demonstriert. Bei erwachsenen CD3 ϵ -defizienten Mäusen zeigte sich zudem im Rotarod-Test eine eingeschränkte Mobilität. In einer weiteren Veröffentlichung von Baudouin et al. (2008) wurde die Expression der ζ -Kette in Hippocampus-Neuronen der Ratte beschrieben. Die gezielte genetische Ausschaltung verdeutlichte eine zentrale Rolle der ζ -Kette bei der Dendriten- Verzweigung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Annahme, dass das Immun-Molekül CD3 nicht nur neuronale Funktionen im Gehirn übernimmt, sondern auch in den DRGs funktionsfähig exprimiert sein könnte. Der CD3-Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit an Milzschnitten getestet und zeigte dort CD3-positive Zellen in den T-Zell-Bereichen. Zudem ließen sich Neurone in DRG-Schnitten und in Neuronen-Kulturen der Maus mit anti-CD3 anfärben. Ein Western Blot mit Proben der Milz, von DRGs und DRG-Kulturen zeigt zudem eine 23 kDa-Bande, die der Größe von CD3 entspricht und untermauert somit die Annahme, dass Neurone CD3 exprimieren könnten. Die hier dargestellten Ergebnisse, verbunden mit der Literatur, lassen es plausibel erscheinen, dass Immun- und Nervensystem ein gemeinsames molekulares Repertoire besitzen.

In dem Fall, dass die markierten T-Zell- (CD3; TCR- α ; TCR- $\alpha\beta$), Makrophagen- (CD68; F4/80) und Leukozytenantigene (CD11a) auch auf DRG-Neuronen funktionell sein sollten, läge die Vermutung nahe, dass Neurone auch immunologische Aufgaben übernehmen könnten.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Übersicht zur Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen.....	8
Abbildung 2 Schematische Darstellung des Prozesses der Nozizeption.....	10
Abbildung 3 Darstellung einer sensorischen Nozizeptorendigung umgeben von Immunzellen (I), Epithelzellen (E), Synoviozyten (S), Osteoklasten (O) und von Mediatoren, die von diesen Zellen stammen	14
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Invasion von Makrophagen ins DRG mit dem Ziel die Fragestellungen und Hypothesen, die in dieser Arbeit verfolgt wurden zu illustrieren.	18
Abbildung 5 Griess Reaktion:	26
Abbildung 6 BMDM in Monokultur	43
Abbildung 7 Durchflusszytometer-Analyse von BMDM mit den Markern F4/80 und CD11b	45
Abbildung 8 Immunzytochemische Analyse ruhender BMDM (7 Tage) mit CD68	46
Abbildung 9 Zeitverlauf der Zytokin- und NO-Sekretion in BMDM-Monokulturen nach LPS/IFN- γ -Zugabe.	48
Abbildung 10 DRG-Neurone in Monokultur	48
Abbildung 11 Charakteristika von DRG-Kulturen	49
Abbildung 12 Zwei verschiedene Systeme zur Kokultivierung von DRG-Neuronen und BMDM.	50
Abbildung 13 Prinzip der Kokultur-Analyse im Calcium Imaging	51
Abbildung 14 Beispiel einer Trypanblau-Färbung in Neuronen-Monokultur	53
Abbildung 15 Trypanblau-Test zum Vergleich neuronaler Mortalitätsraten von Monokulturen und Kokulturen nach 48 stündiger unterschiedlicher Stimulation	54
Abbildung 16 Korrelation der NO-Konzentration und der neuronalen Mortalitätsrate in Kultur.	55
Abbildung 17 CGRP-Freisetzung von DRG-Neuronen in LPS/IFN- γ -stimulierten direkten Kokulturen und Neuronen-Monokulturen im Vergleich.....	57
Abbildung 18 Proliferationsrate von BMDM in Monokultur und direkter Kokultur mit KCl- oder Capsaicin-Stimulation und im Vergleich zur indirekten Kokultur nach 24 Stunden.....	59
Abbildung 19 Proliferationsrate von BMDM in der „Mitte“ direkter Kokulturen in Abhängigkeit von TNF- α und NO	60
Abbildung 20 Expressionsmuster von BMDM (20A Maus; 20B Ratte) nach verschiedenen Aktivierungsarten	61

Abbildung 21 Markierung von Makrophagen in lumbalen DRG-Schnitten.....	63
Abbildung 22 Charakterisierung von Makrophagen in den DRGs 3 Tage nach AIA-Induktion (Ratte).....	64
Abbildung 23 CGRP-Freisetzung von DRG-Neuronen in Kultur (1-2 Tage) abhängig von KCl, IL-6 und sIL6R	65
Abbildung 24 CD68-Markierung (Wirt: Ratte, Serotec) neuronaler Zellen in der Maus	66
Abbildung 25 Test von CD68 (Wirt: Ratte; Abcam und Wirt: Kaninchen; Abcam) Antikörpern auf Milz und DRG-Kryoschnitten der Maus.	67
Abbildung 26 Markierung von DRG-Neuronen (Maus) mit den Immunzellmarkern gegen CD11a, CD11b und F4/80.....	68
Abbildung 27 Test von T-Zell spezifischen Antikörpern im DRG der Ratte.	69
Abbildung 28 Western Blot mit CD3 und β -Aktin	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste primärer Antikörper	35
Tabelle 2 Liste sekundärer Antikörper	36
Tabelle 3 Profil der Zytokinsekretion von BMDM abhängig von ihrem Aktivierungsstatus .	47
Tabelle 4 Vergleich der Zytokin- und NO-Konzentrationen in Überständen von Monokulturen und direkten bzw. indirekten Kokulturen nach 24-stündiger LPS/IFN- γ Stimulation.....	52

Quellenverzeichnis

- Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, Reichling DB, Levine JD (2008) Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and Src tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *Journal of Neuroscience* 28:1046-1057.
- Ashley JW, Shi ZQ, Zhao HB, Li XS, Kesterson RA, Feng X (2011) Genetic ablation of CD68 results in mice with increased bone and dysfunctional osteoclasts. *Plos One* 6.
- Averbeck B, Izydorczyk I, Kress M (2000) Inflammatory mediators release calcitonin gene-related peptide from dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neuroscience* 98:135-140.
- Baecklund E, Sundstrom C, Ekbom A, Catrina AI, Biberfeld P, Feltelius N, Klareskog L (2003) Lymphoma subtypes in patients with rheumatoid arthritis - Increased proportion of diffuse large B cell lymphoma. *Arthritis and Rheumatism* 48:1543-1550.
- Barouch R, Kazimirsky G, Appel E, Brodie C (2001) Nerve growth factor regulates TNF- α production in mouse macrophages via MAP kinase activation. *Journal of Leukocyte Biology* 69:1019-1026.
- Bird GC, Han JS, Fu Y, Adwanikar H, Willis WD, Neugebauer V (2006) Pain-related synaptic plasticity in spinal dorsal horn neurons: role of CGRP. *Molecular Pain* 2.
- Boettger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stockigt R, Segond von Banchet G, Brauer R, Schaible H-G (2008) Antinociceptive effects of tumor necrosis factor α neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 58:2368-2378.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR (1977a) Antigen-Induced Arthritis in Mice .1. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis and Rheumatism* 20:841-850.
- Brackertz D, Mitchell GF, Vadas MA, Mackay IR (1977b) Studies on Antigen-Induced Arthritis in mice .3. Cell and serum transfer experiments. *Journal of Immunology* 118:1645-1648.
- Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB (1998) The expression of P2X(3) purinoreceptors in sensory neurons: Effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Molecular and Cellular Neuroscience* 12:256-268.
- Brenn D, Richter F, Schaible H-G (2007) Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat - An inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis and Rheumatism* 56:351-359.
- Chen XJ, Alessandri-Haber N, Levine JD (2007) Marked attenuation of inflammatory mediator-induced C-fiber sensitization for mechanical and hypotonic stimuli in TRPV4(-/-) mice. *Molecular Pain* 3.
- Chiu SY, Wilson GF (1989) The role of potassium channels in schwann-cell proliferation in wallerian degeneration of explant rabbit sciatic-nerves. *Journal of Physiology-London* 408:199-222.

- Conti G, Scarpini E, Baron P, Livraghi S, Tiriticco M, Bianchi R, Vedeler C, Scarlato G (2002) Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-beta and p75NTR. *Journal of the Neurological Sciences* 195:35-40.
- Corrales A, Montoya JV, Sutachan JJ, Cornillez-Ty G, Garavito-Aguilar Z, Fang X, Blanck TJJ, Recio-Pinto E (2005) Transient increases in extracellular K⁺ produce two pharmacological distinct cytosolic Ca²⁺ transients. *Brain Research* 1031:174-184.
- Cuesta MC, Quintero L, Pons H, Suarez-Roca H (2002) Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochemistry International* 40:301-306.
- de la Hoz CLR, Oliveira ALR, Queiroz LS, Langone F (2003) Wallerian degeneration in C57BL/6J and A/J mice: differences in time course of neurofilament and myelin breakdown, macrophage recruitment and iNOS expression. *Journal of Anatomy* 203:567-578.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal-macrophages - comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 141:2407-2412.
- Eerola E, Mottonen T, Hannonen P, Luukkainen R, Kantola I, Vuori K, Tuominen J, Toivanen P (1994) Intestinal flora in early rheumatoid-arthritis. *British Journal of Rheumatology* 33:1030-1038.
- Feng Y, Tang YM, Guo JX, Wang X (1997) Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sciences* 61:P1281-P1287.
- Flavin MP, Ho LT, Coughlin K (1997) Neurotoxicity of soluble macrophage products in vitro - Influence of dexamethasone. *Experimental Neurology* 145:462-470.
- Gbarah A, Gahmberg CG, Ofek I, Jacobi U, Sharon N (1991) Identification of the leukocyte adhesion molecules Cd11 and Cd18 as receptors for type 1-fimbriated (mannose-specific) *Escherichia-Coli*. *Infection and Immunity* 59:4524-4530.
- Gensel JC, Nakamura S, Guan Z, van Rooijen N, Ankeny DP, Popovich PG (2009) Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. *Journal of Neuroscience* 29:3956-3968.
- Gilad GM, Gilad VH (1995) Chemotaxis and accumulation of nerve growth-factor by microglia and macrophages. *Journal of Neuroscience Research* 41:594-602.
- Gomes RN, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Soares MBP, Shoemaker CB, David JR, Bozza MT (2005) Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. *Shock* 24:590-594.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3:23-35.

- Groh J, Heintl K, Kohl B, Wessig C, Greeske J, Fischer S, Martini R (2010) Attenuation of MCP-1/CCL2 expression ameliorates neuropathy in a mouse model for Charcot-Marie-Tooth 1X. *Human Molecular Genetics* 19:3530-3543.
- Guilbert LJ, Winklerlowen B, Smith A, Branch DR, Garcialloret M (1993) Analysis of the synergistic stimulation of mouse macrophage proliferation by macrophage-colony-stimulating factor (Csf-1) and tumor-necrosis-factor-alpha (Tnf-alpha). *Journal of Leukocyte Biology* 54:65-72.
- Guler-Yuksel M, Allaart CF, Goekoop-Ruiterman YPM, de Vries-Bouwstra JK, van Groenendaal JHLM, Mallee C, de Bois MHW, Breedveld FC, Dijkmans BAC, Lems WF (2009) Changes in hand and generalised bone mineral density in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68:330-336.
- Handwerker HO, Kilo S, Reeh PW (1991) Unresponsive afferent nerve-fibers in the sural nerve of the rat. *Journal of Physiology-London* 435:229-242.
- Hensellek S, Brell P, Schaible H-G, Bräuer R, Segond von Banchet G (2007) The cytokine TNF alpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 36:381-391.
- Hess A, Axmann R, Rech J, Finzel S, Heindl C, Kreitz S, Sergeeva M, Saake M, Garcia M, Kollias G, Straub RH, Sporns O, Doerfler A, Brune K, Schett G (2011) Blockade of TNF-alpha rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:3731-3736.
- Hikawa N, Takenaka T (1996) Myelin-stimulated macrophages release neurotrophic factors for adult dorsal root ganglion neurons in culture. *Cellular and Molecular Neurobiology* 16:517-528.
- Horn KP, Busch SA, Hawthorne AL, van Rooijen N, Silver J (2008) Another barrier to regeneration in the CNS: Activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *Journal of Neuroscience* 28:9330-9341.
- Hou LF, Li WJ, Wang X (2003) Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats. *Journal of Neuroscience Research* 73:188-197.
- Huu TP (1993) Leu-Cams Leukocyte adhesion molecules. *Presse Medicale* 22:1357-1362.
- Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM (2014) Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 17:109-118.
- Kangrga I, Larew JSA, Randic M (1990) The effects of substance-P and calcitonin gene-related peptide on the efflux of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn in vitro. *Neuroscience Letters* 108:155-160.
- Kilo S, HardingRose C, Hargreaves KM, Flores CM (1997) Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin. *Pain* 73:201-207.

- Kim D, You B, Lim H, Lee SJ (2011) Toll-like receptor 2 contributes to chemokine gene expression and macrophage infiltration in the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. *Molecular Pain* 7.
- Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research* 2:189-202.
- Knoller N, Auerbach G, Fulga V, Zelig G, Attias J, Bakimer R, Marder JB, Yoles E, Belkin M, Schwartz M, Hadani M (2005) Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: Phase I study results. *Journal of Neurosurgery-Spine* 3:173-181.
- Komori T, Morikawa Y, Inada T, Hisaoka T, Senba E (2011) Site-specific subtypes of macrophages recruited after peripheral nerve injury. *Neuroreport* 22:911-917.
- Kroot EJA, de Jong BAW, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FHJ, van't Hof M, van de Putte LBA, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PLCM (2000) The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43:1831-1835.
- Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Gottfried E, Brockhoff G, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M (2003) [The "classical" macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 87:215-223.
- Larivière RC, Nguyen MD, Ribeiro-Da-Silva A, Julien JP (2002) Reduced number of unmyelinated sensory axons in peripherin null mice. *Journal of Neurochemistry* 81:525-532.
- Leffler A, Monter B, Koltzenburg M (2006) The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. *Neuroscience* 139:699-709.
- Linda H, Skold MK, Ochsmann T (2011) Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury. *Frontiers in neurology* 2:30.
- Louis SM, Jamieson A, Russell NJW, Dockray GJ (1989) The role of substance-P and calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation and vasodilatation in the rat. *Neuroscience* 32:581-586.
- Maeda K, Mehta H, Drevets DA, Coggeshall KM (2010) IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood* 115:4699-4706.
- Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI (2008) Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67:1488-1492.
- Malefyt RD, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Devries JE (1991a) Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes - an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174:1209-1220.

- Malefyt RD, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Tevelde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, Devries JE (1991b) Interleukin-10 (IL-10) and viral-IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-Cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down-regulation of class-I major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174:915-924.
- Manjavachi MN, Motta EM, Marotta DM, Leite DFP, Calixto JB (2010) Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. *Pain* 151:345-355.
- McInnes IB, Schett G (2011) MECHANISMS OF DISEASE The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* 365:2205-2219.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology* 164:6166-6173.
- Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ (2009) Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *American Journal of Pathology* 175:2454-2462.
- Mosmann TR, Moore KW (1991) The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitol Tod*:A49-A53.
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B (1996) Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 39:115-124.
- Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999) Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology* 163:3771-3777.
- Murphy JK, Forman HJ (1993) Effects of sodium and proton pump activity on respiratory burst and PH regulation of rat alveolar macrophages. *American Journal of Physiology* 264:L523-L532.
- Nakamura K, Hirai H, Torashima T, Miyazaki T, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji M, Lin QS, Tsukamoto K, Nishimura H, Ono M, Watanabe M, Hirose S (2007) CD3 and immunoglobulin G Fc receptor regulate cerebellar functions. *Molecular and Cellular Biology* 27:5128-5134.
- Natura G, Segond von Banchet G, Schaible H-G (2005) Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats. *Pain* 116:194-204.
- Oh U, Hwang SW, Kim DH (1996) Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Neuroscience* 16:1659-1667.
- Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8222-8226.
- Olsen NJ, Jasin HE (1985) Synthesis of Rheumatoid-Factor Invitro - Implications for the Pathogenesis of Rheumatoid-Arthritis. *Semin Arthritis Rheu* 15:146-156.

- Oprea A, Kress M (2000) Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: Effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Journal of Neuroscience* 20:6289-6293.
- Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chirosso G, Lobb R (1989) Direct expression cloning of vascular cell-adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.
- Pai RK, Askew D, Boom WH, Harding CV (2002) Regulation of class II MHC expression in APCs: Roles of types I, III, and IV class II transactivator. *Journal of Immunology* 169:1326-1333.
- Pedersenbjergaard U, Nielsen LB, Jensen K, Edvinsson L, Jansen I, Olesen J (1991) Calcitonin gene-related peptide, neurokinin-a and substance-P - effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. *Peptides* 12:333-337.
- Pelegrin P, Surprenant A (2009) Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *Embo Journal* 28:2114-2127.
- Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Jonas BM, Sevcik MA, Koewler NJ, Ghilardi JR, Wong GY, Mantyh PW (2007) Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Experimental Neurology* 203:42-54.
- Peters MJL, Voskuyl AE, Sattar N, Dijkmans BAC, Smulders YM, Nurmohamed MT (2010) The interplay between inflammation, lipids and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: why ratios may be better. *International journal of clinical practice* 64:1440-1443.
- Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, Dieli F, Ghisletti S, Natoli G, De Baetselier P, Mantovani A, Sica A (2009) Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:14978-14983.
- Qin HW, Holdbrooks AT, Liu YD, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN (2012) SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *Journal of Immunology* 189:3439-3448.
- Qin XM, Wan Y, Wang X (2005) CCL2 and CXCL1 trigger calcitonin gene-related peptide release by exciting primary nociceptive neurons. *Journal of Neuroscience Research* 82:51-62.
- Richards PJ, Williams AS, Goodfellow RM, Williams BD (1999) Liposomal clodronate eliminates synovial macrophages, reduces inflammation and ameliorates joint destruction in antigen-induced arthritis. *Rheumatology* 38:818-825.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 185:461-469.

- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE (2004) Ca^{2+} /calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *Journal of General Physiology* 123:53-62.
- Ryu PD, Gerber G, Murase K, Randic M (1988) Calcitonin gene-related peptide enhances calcium current of rat dorsal-root ganglion neurons and spinal excitatory synaptic transmission. *Neuroscience Letters* 89:305-312.
- Schäfer KH, Mestres P, Marz P, Rose-John S (1999) The IL-6/sIL-6R fusion protein hyper-IL-6 promotes neurite outgrowth and neuron survival in cultured enteric neurons. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19:527-532.
- Segond von Banchet G, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible H-G (2002) Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 110:131-145.
- Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Bräuer R, Schaible H-G (2009) Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- α -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain* 145:151-159.
- Segond von Banchet G, Boettger MK, Fischer N, Gajda M, Brauer R, Schaible H-G (2009) Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- α -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain* 145:151-159.
- Seijffers R, Mills CD, Woolf CJ (2007) ATF3 increases the intrinsic growth state of DRG neurons to enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 27:7911-7920.
- Shen KF, Zhu HQ, Wei XH, Wang J, Li YY, Pang RP, Liu XG (2013) Interleukin-10 down-regulates voltage gated sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Experimental Neurology* 247:466-475.
- Shibata Y (1995) Prostaglandin E_2 release triggered by phagocytosis of latex-particles - a distinct association with prostaglandin synthase isozymes in bone-marrow macrophages. *Journal of Immunology* 154:2878-2887.
- Southall MD, Vasko MR (2000) Prostaglandin E_2 -mediated sensitization of rat sensory neurons is not altered by nerve growth factor. *Neuroscience Letters* 287:33-36.
- Takeuchi A, Miyaishi O, Kiuchi K, Isobe K (2001) Macrophage colony-stimulating factor is expressed in neuron and microglia after focal brain injury. *Journal of Neuroscience Research* 65:38-44.
- Tang HB, Li YS, Nakata Y (2007) The release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons requires the non-neuronal cells around these neurons. *Journal of Pharmacological Sciences* 105:264-271.
- Tang HB, Li YS, Miyano K, Nakata Y (2008) Phosphorylation of TRPV1 by neurokinin-1 receptor agonist exaggerates the capsaicin-mediated substance P release from cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 55:1405-1411.

- Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, Brollo M, Mansuy D, Boucher JL (1999) Effects of the new arginase inhibitor N omega-hydroxy-nor-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 3:427-438.
- Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000) Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 15:170-182.
- Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K (1999) Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *British Journal of Pharmacology* 126:429-436.
- Ulmann L, Hirbec H, Rassendren F (2010) P2X4 receptors mediate PGE2 release by tissue-resident macrophages and initiate inflammatory pain. *Embo Journal* 29:2290-2300.
- Umeda S, Takahashi K, Shultz LD, Naito M, Takagi K (1996) Effects of macrophage colony-stimulating factor on macrophages and their related cell populations in the osteopetrosis mouse defective in production of functional macrophage colony-stimulating factor protein. *American Journal of Pathology* 149:559-574.
- van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ (2002) Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Research* 4:87-93.
- van der Helm-van Mil AHM, Wesoly JZ, Huizinga TWJ (2005) Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17:299-304.
- Vereyken EJF, Heijnen PDAM, Baron W, de Vries EHE, Dijkstra CD, Teunissen CE (2011) Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *Journal of Neuroinflammation* 8.
- Vicente R, Escalada A, Soler C, Grande M, Celada A, Tamkun MM, Solsona C, Felipe A (2005) Pattern of Kv beta subunit expression upon proliferation and the mode of in macrophages depends activation. *Journal of Immunology* 174:4736-4744.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ (2010) Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 62:2662-2672.
- Witting A, Müller P, Herrmann A, Kettenmann H, Nolte C (2000) Phagocytic clearance of apoptotic neurons by microglia/brain macrophages in vitro. *Journal of Neurochemistry* 75:1060-1070.
- Wu D, Zhang Y, Bo X, Huang W, Xiao F, Zhang X, Miao T, Magoulas C, Subang MC, Richardson PM (2007) Actions of neurotrophic cytokines and cyclic AMP in regenerative conditioning of rat primary sensory neurons. *Exp Neurol* 204:66-76.
- Yakovleva OV, Shafigullin MU, Sitdikova GF (2013) The role of nitric oxide in the regulation of neurotransmitter release and processes of exo- and endocytosis of synaptic vesicles in mouse motor nerve endings. *Neurochem J* 7:103-110.

- Yaraee R, Ebtekar M, Ahmadiani A, Sabahi F (2003) Neuropeptides (SP and CGRP) augment pro-inflammatory cytokine production in HSV-infected macrophages. *International Immunopharmacology* 3:1883-1887.
- Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, Modolell M, Palacin M, Lloberas J, Celada A (2006) Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *European Journal of Immunology* 36:1516-1526.
- Zhang N, Inan S, Cowan A, Sun RH, Wang JM, Rogers TJ, Caterina M, Oppenheim JJ (2005) A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4536-4541.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist. Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und habe alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in ihrer Gesamtheit noch in wesentlichen Teilen an einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit in jeglicher Form eingereicht habe.

Bei der Konzeption meiner Forschungsarbeit und der Herstellung des Manuskripts hat mich Prof. Dr. Hans-Georg Schaible angeleitet. PD Dr. Gisela Segond von Banchet hat mich bei der Auswahl und Einarbeitung der genutzten Methoden unterstützt. Die Ergebnisse der LSM-Mikroskopie sind unter Anleitung von Dr. Annett Eitner entstanden. Mit ihr habe ich die Mikroskopie-Ergebnisse kritisch diskutiert und sie hat mich bei der Erstellung des Manuskripts beraten. Bei der Durchflusszytometrie haben mich Dr. Oliver Frey und Dipl.-Biochemiker Martin Böttcher aus dem Institut für Immunologie (Jena) beraten und betreut.

Jena, 19.03.2014

Julia Massier

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name : Massier, Julia

Geburtsdatum : 02.05.1985

Geburtsort : Naumburg

Nationalität : Deutsch

Familienstand : ledig

Werdegang:

1991 - 1995 : Grundschule Großheringen

1995 - 1997 : Realschule Auerstedt

1997 - 2004 : Lepsius-Gymnasium Naumburg; Abschluss: Abitur

2004 - 2009 : FSU-Jena, Biologie Diplom Studium

: HF: Mikrobiologie; NF: Immunbiologie, Genetik, Biochemie

10.2008 - 07.2009 : Diplomarbeit

Hans-Knöll-Institut Jena, Abteilung für Zell- und Molekularbiologie

Arbeitsgruppe Dr. F. Hänel

Thema: Analyse der Interaktion chlamydialer Proteine mit

Wirtszellproteinen

10.2009 - 09.2014 : Wissenschaftliche Mitarbeiterin; Promotion

Universitätsklinikum Jena; Institut für Neurophysiologie

Sprachen: : Englisch

: Englisch

Julia Massier

Jena, den 2.10.2014

Eigene Referenzen

1. Vortrag Establishment of a coculture system to study the interaction of murine macrophages and dorsal root ganglia neurons in vitro; Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft; Regensburg; März 2011
2. Poster J. Massier; G. Segond von Banchet; H.-G. Schaible; Macrophages have the potential to activate and to kill DRG neurons – an in vitro coculture study; World Congress on pain; Mailand; Oktober 2012
3. Poster J. Massier; A. Eitner; G. Segond von Banchet; H.-G. Schaible; Dorsal root ganglia-immigrated macrophages are not aggressive but can potentially promote nociception; Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft; Heidelberg; März 2013
4. Paper Julia Massier, Annett Eitner, Gisela Segond von Banchet, Hans-Georg Schaible
Neuroimmune interactions of rodent macrophages and sensory neurons.
Implications for joint pain

submitted to Arthritis and Rheumatology

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Hans-Georg Schaible für die Vergabe des spannenden Forschungsthemas. Er hat mich auch während Erfolgslücken immer wieder motiviert, hat Ergebnisse kritisch hinterfragt und die Entwicklung des Projektes mit Interesse verfolgt und geformt. Auch vielen Dank an ihn für die Möglichkeit eigene Ideen einzubringen und umzusetzen.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Frau Dr. Annett Eitner für ihr ständiges Interesse an meinem Forschungsprojekt. Ihre Unterstützung bei problematischen Antikörpermarkierungen sowie ihre Hilfe bei der Mikroskopie haben meine Arbeit sehr katalysiert.

Vielen Dank an Frau Dr. Gisela Segond von Banchet für ihre geduldige Einarbeitung in die Laborgeheimnisse, ihre methodischen Hilfestellungen und ihre Bereitschaft sich immer wieder meiner Probleme anzunehmen.

Frau Antje Wallner möchte ich danken für die strukturierte Organisation des Zellkultur-Labors und für ihre zuverlässige technische Assistenz. Frau Konstanze Ernst möchte ich meinen Dank ausdrücken für die Umsorgung der Tierbestellungen, die nicht ganz einfach waren, wenn nicht alle Laborschäfchen rechtzeitig wussten was sie brauchten.

Allen Mitarbeitern der Physiologie möchte ich sehr danken für ihre Hilfsbereitschaft und die harmonische und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Man kommt sehr gern auf Arbeit, wenn man hin und wieder etwas zu lachen hat und die eine oder andere „Kabaretteinlage“ im Frühstücksraum oder im Labor wird mir noch lange in Erinnerung bleiben.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt sehr viel Dank als Quelle meiner Motivation. Es ist wichtig Leidensgenossen, Zuhörer, Kritiker und ein Ablenkungskomitee zu haben.